

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la purificación de carbohidratos prebióticos



Fernando Óscar Montañés Salcedo

Tesis doctoral
Septiembre de 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la purificación de carbohidratos prebióticos

Memoria presentada por:

Fernando Óscar Montañés Salcedo

Para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Agustín Olano Villén
(Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC)

Dra. Elena Ibáñez Ezequiel
(Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer de manera muy especial a mis directoras de tesis, el Dr. Agustín Olano y la Dra. Elena Ibáñez, por haberme concedido la oportunidad de comenzar este trabajo y por su confianza en mi para llevarlo a cabo, por transmitirme sus conocimientos pues de ellos he aprendido todo durante este tiempo (y continúo aprendiendo), así como su apoyo incondicional en el ámbito personal.

Mi reconocimiento al Instituto de Fermentaciones Industriales y a todo el equipo directivo, muy especialmente a su Directora, la Dra. Lourdes Amigo, por los recursos técnicos y académicos puestos al alcance para mi formación académica y científica.

A las Dra. Tiziana Fornari por su inestimable colaboración en este trabajo, así como por su paciencia para la resolución de mis múltiples dudas, tanto técnicas como conceptuales y su disposición absoluta. A las Dras. Antonia Montilla y Nieves Corzo, por su ayuda no sólo en aspectos técnicos, si no también por facilitarme la integración en el grupo.

A Miryam por su acertada filosofía de vida.

También al resto de personas con las que he compartido cada día, tanto de mi grupo, Dra. Mar Villamiel, Dra. Dolores del Castillo, Dr. Javier Moreno, Dra. Ana Cristina Soria, Dra. Valle Morales, José Manuel, Alejandra, Marta, Cristina, Juliana, Ana, Kika y Vassilis (y he compartido durante estos cuatro años), como del resto del Instituto, especialmente del grupo supercrítico, Irene, Merichel y Jose. Muchas gracias también, al Dr. Pedro J. Martín-Álvarez por su ayuda con la parte estadística de esta tesis.

Especialmente quiero agradecer al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Arkansas por los medios técnicos puestos a mi disposición durante los meses de mi estancia y, en particular, al Dr. Jerry W. King y su grupo de investigación, Keerthi y Dong Feng, por su inigualable hospitalidad.

No querría olvidarme de agradecer la ayuda prestada en todo momento por el Departamento de Química Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, especialmente a mi tutor Francisco Javier Señoráns Rodríguez.

Finalmente en el ámbito familiar agradecer el apoyo recibido por mi *fiancee* Carmen, mis padres y mi hermana por su enorme interés por conocer el mundo de los fluidos supercríticos, así como demás familia.

Y por supuesto a Jacinto Callizo y su lema “todo es ponerse” que me acompaña todos los días de mi vida.

Esta tesis ha sido realizada en el departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, gracias a una beca predoctoral para la formación de personal investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS

AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
ACS	American Chemical Society
Al	Aluminio
B	Boro
CEoS	Ecuación cúbica de estado
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
CO₂	Dióxido de carbono
EdE	Ecuación de Estado
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
ELL	Equilibrio Líquido-Líquido
ELV	Equilibrio Líquido-Vapor
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Food for Specific Health Use/ Alimentos para uso sanitario específico
Fru	Fructosa
FUFOSE	Functional Food Science in Europe
Ga	Galactosa
Glu	Glucosa
GOS	Galactooligosacáridos
GRAS	Generally Recognized as Safe
HFCS	Jarabe de Maíz con alto contenido en fructosa
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
Lu	Lactulosa
MHV2	Reglas de mezclado de segundo orden de Huron-Vidal
NRTL	Non Random Two Liquids
OND	Oligosacáridos No Digeribles
PEL	Límite de Exposición Permisible
PR	Peng-Robinson
ps	Peso seco
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados
SCCO₂	Dióxido de carbono supercrítico
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SFE	Extracción con Fluidos Supercríticos
SRK	Soave-Redlich-Kwong
Ta	Tagatosa
UE	Unión Europea
UNIFAC	Universal Functional Activity Coefficient
UNIQUAC	Universal Quasi Chemical
vdW	Van der Waals
WHO	Organización Mundial de la Salud

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

En la presente memoria se exponen los resultados más relevantes obtenidos durante la realización del trabajo de investigación titulado “Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la purificación de carbohidratos prebióticos”, en el que se ha estudiado la posibilidad de fraccionar mezclas complejas de carbohidratos procedentes de isomerizados mediante una tecnología limpia de extracción, como es la extracción con fluidos supercríticos (SFE). Este enfoque resulta completamente novedoso, ya que nunca hasta la fecha se había llevado a cabo esta combinación. Los diferentes capítulos son pequeños hitos que han permitido conocer el comportamiento del sistema modelo propuesto (considerando carbohidratos+CO₂+modificador+condiciones de extracción supercríticas) y aplicar estos conocimientos a cada paso hasta llegar al objetivo final.

Esta memoria está dividida en cuatro capítulos: introducción (I), materiales y métodos (II), resultados y discusión (III) y conclusiones (IV). El capítulo de resultados y discusión está dividido en seis apartados correspondientes a las diferentes etapas en las que se ha dividido la parte experimental de esta Tesis.

El Capítulo I es una introducción que engloba los aspectos más importantes sobre los que trata esta memoria, como son las características y aplicaciones de los fluidos supercríticos en Tecnología de Alimentos, la definición de alimentos funcionales y especialmente de los carbohidratos prebióticos que son el eje central de esta Tesis Doctoral y finalmente una escueta revisión de las bases para el modelado termodinámico de las mezclas carbohidratos/alcoholes/agua.

El Capítulo II explica las diferentes muestras, reactivos y técnicas empleadas para llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

En el Capítulo III, los apartados 1 y 2 tratan sobre el comportamiento de los carbohidratos estudiados en esta memoria en alcoholes o mezclas alcohol/agua. Se realizaron medidas de solubilidades en condiciones atmosféricas y supercríticas como primer paso para conseguir el fraccionamiento de mezclas complejas de carbohidratos. También se llevó a cabo un modelado termodinámico con la ayuda de los valores experimentales obtenidos. El apartado 3 aborda el fraccionamiento selectivo de mezclas modelo de dos carbohidratos prebióticos, lactulosa y tagatosa, de sus correspondientes aldosas, lactosa y galactosa, mediante el uso de la tecnología de extracción supercrítica. Al tratarse los carbohidratos de compuestos polares, en primer lugar se realizaron diversos experimentos para determinar el modificador polar a emplear junto al CO₂ supercrítico. Se realizaron sendos diseños experimentales que permitieron cubrir un amplio rango de condiciones, que incluían la temperatura y la presión de extracción y el flujo del modificador. El apartado 4 recoge los resultados más relevantes de la extracción supercrítica de mezclas complejas de carbohidratos comerciales como es el Vivinal GOS®. Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior a la hora de elegir las condiciones óptimas de extracción y se realizó un estudio de solubilidad a presión atmosférica para elegir el modificador más adecuado. El apartado 5 es el final de la parte experimental y trata de reunir todo el conocimiento adquirido en el resto de los capítulos para fraccionar mezclas complejas de carbohidratos que contienen galactooligosacáridos obtenidas a partir de lactosa mediante una transglucosidación enzimática y sometidas posteriormente a una

isomerización química con borato o aluminato sódico. Lo destacable de este proceso reside en la estabilidad del complejo formado por los aluminatos o los boratos con los carbohidratos y su dificultad para romperlo previa extracción de carbohidratos.

Finalmente el apartado 6 muestra la viabilidad económica y técnica que tendría a nivel industrial el proceso de extracción supercrítica elegido como óptimo en el apartado 6. Para ello se ha empleado el software AspenOne® V7 para la simulación del proceso. La simulación es una parte esencial de estudios de operatividad o riesgos, que asesora sobre las consecuencias del fracaso de la planta y en la mitigación de los posibles efectos. Mejora la comprensión del proceso y es una herramienta poderosa para la optimización de plantas, tanto en el campo operativo como en el de diseño. Este tipo de simulación tiene igual importancia en procesos continuos, batch, semibatch y procesos cíclicos de producción.

Por tanto, el **objetivo principal** del presente trabajo ha sido el desarrollo de métodos de purificación de carbohidratos prebióticos a partir de mezclas complejas de carbohidratos mediante el empleo de procesos de extracción por tecnología de fluidos supercríticos que sean viables técnica y económicamente a nivel industrial para su posterior adición en diferentes alimentos para conferirles su carácter prebiótico.

Para llevar a cabo el objetivo general planteado, se abordaron los siguientes objetivos parciales:

- Estudio de la solubilidad de los diferentes carbohidratos en alcoholes en condiciones de presión atmosférica y supercríticas. Este estudio previo se planteó para permitir establecer la viabilidad técnica del proceso de extracción selectiva de los carbohidratos de interés en condiciones supercríticas. Desarrollo de modelos termodinámicos de utilidad para el escalado de los procesos de extracción supercrítica.
- Optimización de las condiciones de extracción y fraccionamiento de lactulosa y tagatosa, de sus respectivas mezclas con lactosa y galactosa, en condiciones supercríticas. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron técnicas de diseño experimental que suponen una serie de ventajas respecto a la optimización por etapas.
- Optimización de las condiciones de extracción y fraccionamiento de mezclas complejas de carbohidratos disponibles comercialmente. El fraccionamiento de los carbohidratos se abordó según su grado de polimerización para obtener galactooligosacáridos de alta pureza.
- Optimización de las condiciones de extracción y fraccionamiento de mezclas complejas de carbohidratos obtenidas por isomerización química mediante el empleo de catalizadores. Este objetivo se centró en el fraccionamiento de los carbohidratos según su grado de polimerización para obtener galactooligosacáridos de alta pureza y libres de los catalizadores empleados en la isomerización química.

- Escalado teórico del proceso a nivel industrial para determinar su viabilidad técnica y económica.

La Figura 0-1 refleja las etapas que constituyen la presente Tesis Doctoral:

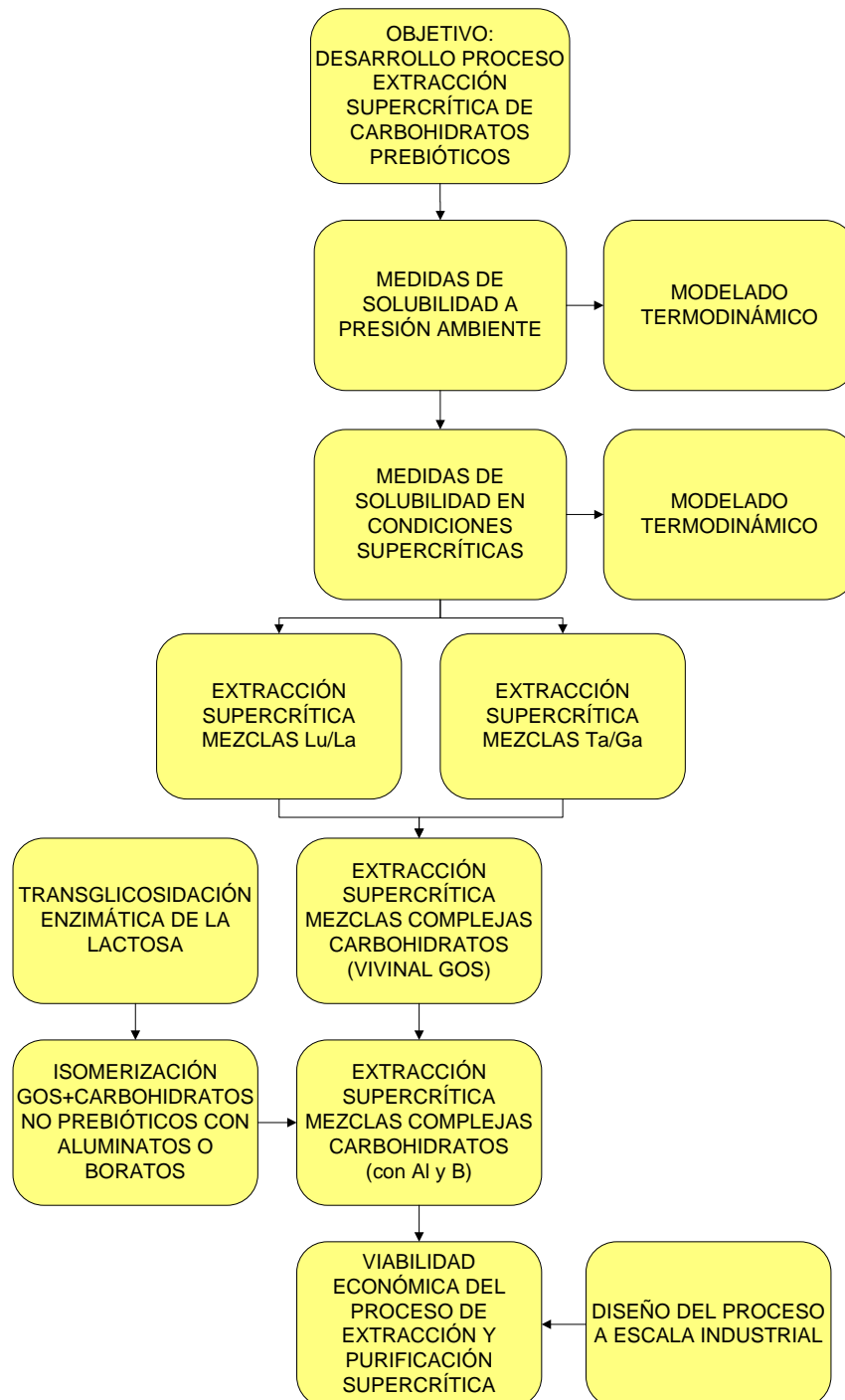


Fig. 0-1.-Diagrama de flujo del desarrollo de esta memoria

ENGLISH SUMMARY

In this PhD report, we present the main results obtained during the development of new processes to obtain pure prebiotic carbohydrates from different origin based on supercritical fluid extraction. These pure or quasi-pure prebiotic carbohydrates may be added to a wide range of food to increase functionality. To achieve this purpose we needed to add modifiers to supercritical CO₂ to obtain good yield and recovery in different supercritical extractions. Finally we obtain prebiotic carbohydrates with a good purity, with a good yield and free from contaminants.

Presentation and objectives

This report is divided into four chapters. Chapter I is an introduction about characteristics and applications of supercritical fluids and prebiotic carbohydrates in food technology. Also the thermodynamic framework used in Chapter III is explained.

Chapter II is a summary about materials and methods used to carry out this Thesis.

In Chapter III results are explained and discussed. Chapter III is divided in seven sections. In sections 1 and 2 is described the behavior of the carbohydrates of interest in alcohol and alcohol/water solvent mixtures. The study was conducted in supercritical and at atmospheric conditions. The data obtained were correlated with adequate thermodynamic modelling.

In section 3, the approach for selective purification of binary carbohydrate mixtures consisting of a prebiotic and a non prebiotic carbohydrates (one prebiotic and non prebiotic carbohydrates) using SCCO₂ is studied. Mixtures tested were lactulose and its aldose lactose, and tagatose and its aldose galactose. Carbohydrates are polar compounds and its extraction with pure CO₂ is not possible, thus, a modifier is needed. An experimental design was developed covering different extraction conditions (pressure, temperature and modifier flow rate) for every mixture.

In section 4, selective fractionation of prebiotic carbohydrates commercially available (Vivinal GOS[®]) are described. Results obtained in section 3 were used for extraction process design. Previous to extraction, a solubility study at atmospheric conditions was conducted to select the most appropriate modifier. Finally, extraction processes were carried out in two steps purifying carbohydrates according to their molecular weight.

Section 5 is the last experimental chapter and deals with supercritical extraction of galactooligosaccharides obtained from enzymatic hydrolysis and chemical isomerization (with boric acid or sodium aluminate). The main challenge was to purify galactooligosaccharides from a carbohydrate complex mixture and eliminate borate or aluminate complexed to carbohydrates during the chemical isomerization step.

Finally, section 6 shows technic and economic viability of an industrial process designed from optimal conditions reached in section 5. AspenOne[®] V7 software was used for this purpose.

Therefore, the **main goal** of this PhD report has been the development of processes, economical and technically viable, using supercritical fluid technology to purify prebiotic carbohydrates from complex carbohydrate mixtures.

To reach this main goal, the following partial goals have been considered:

- Solubility studies of different carbohydrates in supercritical and atmospheric conditions. This first study was established to know the technical viability of the extraction process. At the same time data obtained was adjusted using the proper thermodynamic modelling.
- Optimization of extraction and purification conditions for lactulose and tagatose from its respective aldoses, lactose and galactose. To carry out this study, experimental design techniques were employed.
- Optimization of extraction and purification conditions for complex carbohydrate mixtures commercially available. Carbohydrate fractionation was carried out according its degree of polymerization in order to obtain galactooligosaccharides with high purity.
- Optimization of extraction and purification conditions for complex carbohydrate mixtures obtained from chemical isomerization using catalysts, such as sodium aluminate and boric acid. Carbohydrate fractionation was carried out according its degree of polymerization in order to obtain galactooligosaccharides with high purity and without traces of the boron or aluminium used as catalysts.
- Teoretical industrial scale-up of the final extraction process obtained in previous goal to establish its economic and technical feasibility.

Índice general

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Alimentos Funcionales	1
1.1.1.	Legislación.....	5
1.1.1.1.	Reglamento CE sobre nuevos alimentos	6
1.2.	Carbohidratos prebióticos.....	7
1.2.1.	Lactulosa.....	9
1.2.2.	Tagatosa.....	12
1.2.3.	Galactooligosacáridos.....	15
1.3.	Fluidos Supercríticos.....	21
1.3.1.	Generalidades sobre los fluidos supercríticos	21
1.3.2.	Fluidos supercríticos para la industria alimentaria	25
1.3.3.	Extracción con fluidos supercríticos	27
1.3.3.1.	Legislación.....	27
1.3.3.2.	Equipamiento básico para la extracción supercrítica.....	29
1.3.3.3.	Extracción de carbohidratos con fluidos supercríticos	30
1.4.	Estudio del fraccionamiento de carbohidratos.....	31
1.4.1.	Solubilidades a presión ambiente	31
1.4.1.1.	Solubilidades en sistemas no acuosos y mezcla de disolventes.....	32
1.4.1.2.	Modelado termodinámico	32
1.4.1.2.1.	Elección del modelo termodinámico	33
1.4.1.2.2.	Modelos de coeficientes de actividad	35
1.4.1.2.3.	Modelos de coeficientes de actividad más empleados	35
1.4.1.2.4.	Modelos termodinámicos basados en ecuaciones de estado (EdE).....	36
1.4.2.	Solubilidades en medio supercrítico	38
1.4.2.1.	Comportamiento de fase de los fluidos supercríticos y sus mezclas.....	39
1.4.2.2.	Determinación experimental de solubilidades supercríticas.....	40
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1.	Materiales.....	42
2.1.1.	Muestras	42
2.1.1.1.	Duphalac®	42
2.1.1.2.	Vivinal GOS®	42
2.1.1.3.	Lactozym 3000 L HP G	42
2.1.2.	Reactivos	42
2.2.	Métodos.....	44
2.2.1.	Obtención de GOS isomerizados.....	44
2.2.1.1.	Síntesis enzimática de GOS a partir de Lactozym 3000 L HP G.....	44
2.2.1.2.	Isomerización de GOS.....	44
2.2.1.2.1.	Isomerización con aluminatos.....	44
2.2.1.2.2.	Isomerización con boratos	45
2.2.2.	Solubilidad de carbohidratos	46
2.2.2.1.	Solubilidad en alcoholes a presión atmosférica.....	46
2.2.2.1.1.	Preparación de muestra.....	46

2.2.2.1.1.1.	Monosacáridos y disacáridos	46
2.2.2.1.1.2.	Vivinal GOS®	46
2.2.2.1.1.2.1.	Diseño experimental para las medidas de solubilidad de Vivinal GOS®	47
2.2.2.2.	Solubilidad en CO ₂ supercrítico	48
2.2.2.2.1.	Preparación de muestra	48
2.2.2.2.2.	Descripción del sistema	49
2.2.2.2.3.	Determinación de las solubilidades de los distintos carbohidratos en condiciones supercríticas	51
2.2.2.3.	Fraccionamiento de mezclas de carbohidratos con CO ₂ supercrítico	51
2.2.2.3.1.	Preparación de muestra	51
2.2.2.3.1.1.	Preparación de mezclas binarias de carbohidratos	51
2.2.2.3.1.2.	Preparación de isomerizados de GOS	52
2.2.2.3.1.3.	Preparación de Vivinal GOS®	52
2.2.2.3.2.	Descripción del sistema	53
2.2.2.3.3.	Diseño experimental para las extracciones supercríticas de mezclas binarias cetosa/aldosa	53
2.2.2.3.3.1.	Mezclas lactulosa/lactosa	53
2.2.2.3.3.2.	Mezclas tagatosa/galactosa	55
2.2.2.4.	Análisis de carbohidratos mediante cromatografía de gases	56
2.2.2.4.1.	Preparación de las muestras	56
2.2.2.4.2.	Preparación de trimetil-silil derivados	56
2.2.2.4.2.1.	De carbohidratos	56
2.2.2.4.2.2.	Con N-trimetilsililimidazol	56
2.2.2.4.2.3.	Con piridina, N-trimetilsililimidazol y trimetilclorosilano	57
2.2.2.4.2.4.	De oximas	57
2.2.2.4.3.	Condiciones cromatográficas	57
2.2.2.5.	Análisis de aluminio por ICP-MS	58
2.2.2.6.	Análisis de boro por ICP-MS y espectrometría UV-VIS	59
2.2.2.7.	Análisis de azufre por ICP-MS	60
2.2.2.8.	Modelado termodinámico	60
2.2.2.8.1.	A presión atmosférica	60
2.2.2.8.2.	En condiciones supercríticas	62
2.2.2.8.2.1.	Modelado termodinámico	63
2.2.2.9.	Software de simulación de procesos AspenOne® V7	63
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
3.1.	Solubilidades de carbohidratos en alcoholes a presión atmosférica	66
3.1.1.	Resultados y discusión	67
3.1.1.1.	Medida experimental de las solubilidades de los azúcares y sus mezclas	67
3.1.1.2.	Modelado termodinámico de las solubilidades de diferentes carbohidratos en mezclas alcohol-alcohol y alcohol-agua a presión atmosférica	70
3.1.1.3.	Cálculo de la solubilidad de carbohidratos en alcoholes puros	70
3.1.1.4.	Cálculo de la solubilidad de carbohidratos en agua	74
3.1.1.5.	Predicción de la solubilidad de carbohidratos en mezclas ternarias carbohidrato-alcohol-alcohol y carbohidrato-alcohol-agua	75
3.1.2.	Conclusiones	76
3.2.	Medidas de solubilidades de carbohidratos en condiciones supercríticas	78
3.2.1.	Resultados y discusión	79

3.2.1.1.	Solubilidades de los distintos carbohidratos en condiciones supercríticas. Experimental.	79
3.2.1.2.	Solubilidades en condiciones supercríticas. Modelado termodinámico empleando la EdE de Soave-Redlich-Kwong con las reglas modificadas de segundo orden de Huron-Vidal (SRK-MHV2).....	84
3.2.1.2.1.	Estimación de propiedades de los componentes puros.....	85
3.2.1.3.	Modelado termodinámico.....	86
3.2.2.	Conclusiones.....	87
3.3.	Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para mezclas lactulosa/lactosa y tagatosa/galactosa.....	88
3.3.1.	Resultados y discusión.....	89
3.3.1.1.	Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para mezclas lactulosa/lactosa	89
3.3.1.1.1.	Selección de la composición del modificador.....	89
3.3.1.1.2.	Efecto de los factores.....	91
3.3.1.2.	Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para mezclas tagatosa/galactosa	97
3.3.1.2.1.	Selección de la composición del modificador.....	97
3.3.1.2.2.	Efecto de los factores.....	99
3.3.2.	Conclusiones.....	105
3.4.	Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para galactooligosacáridos prebióticos	107
3.4.1.	Resultados y discusión.....	109
3.4.1.1.	Comportamiento de la solubilidad de la mezcla comercial de GOS en soluciones etanol/agua	109
3.4.1.2.	Extracción de la mezcla comercial de GOS por tecnología de fluidos supercríticos empleando SCCO ₂ y etanol/agua como modificador.....	113
3.4.1.2.1.	Mezcla etanol/agua 97.6/2.4 % (v/v) como modificador	113
3.4.1.2.2.	Mezcla etanol/agua 95/5 % (v/v) como modificador.....	116
3.4.2.	Conclusiones.....	118
3.5.	Fraccionamiento de mezclas complejas de carbohidratos prebióticos en condiciones supercríticas producidas por transglucosilación enzimática e isomerizadas con aluminatos o boratos	120
3.5.1.	Resultados y Discusión.....	121
3.5.1.1.	Síntesis enzimática de GOS.....	121
3.5.1.2.	Isomerización de GOS sintetizados enzimáticamente con aluminato sódico o ácido bórico	121
3.5.1.3.	Extracción supercrítica de mezclas complejas de carbohidratos con aluminato sódico.....	124
3.5.1.4.	Extracción supercrítica de mezclas complejas de carbohidratos con ácido bórico.....	132
3.5.2.	Conclusiones.....	138
3.6.	Escalado del proceso para la extracción selectiva de carbohidratos prebióticos a partir de las mezclas obtenidas en el apartado 3.5.....	140
3.6.1.	Resultados y Discusión.....	140
3.6.1.1.	Elección del proceso con mayor cantidad de carbohidratos prebióticos	140
3.6.1.2.	Simulación del proceso.....	141
3.6.1.3.	Determinación de la viabilidad económica del proceso.....	143
3.6.2.	Conclusiones.....	148
4.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	150
4.1.	Conclusiones.....	150
4.2.	Perspectivas de futuro	151
4.3.	Final Conclusions.....	152
5.	BIBLIOGRAFÍA	154

6.	ANEXOS	166
6.1.	Anexo 1. Marco teórico para el modelado termodinámico de solubilidades a presión atmosférica	166
6.2.	Anexo 2. Marco teórico para el modelado termodinámico de solubilidades en condiciones supercríticas	168
6.2.1.	Extensión de las EdE a mezclas: reglas de mezclado.....	168
6.2.2.	Modelado del equilibrio sólido-líquido-gas en SCCO ₂ aplicando un modelo que combina una EdE con un modelo de coeficiente de actividad para las reglas de mezclado.....	168
6.2.2.1.	Función exceso de una EdE.....	168
6.2.2.2.	Método Huron-Vidal (HV).....	169
6.2.2.3.	Métodos de presión cero.....	170
6.3.	Anexo 3. Isomerización de GOS con aluminato sódico y ácido bórico.....	173
6.4.	Anexo 4. Índices	176
6.4.1.	Índice de Tablas	176
6.4.2.	Índice de Figuras	178
6.5.	Anexo 5. Publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis	181

Capítulo I: Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos Funcionales

En la actualidad la nutrición está experimentando un cambio significativo, así, el concepto clásico de nutrición equilibrada, es decir, aquella que aporta a través de los alimentos las correctas proporciones de los nutrientes básicos (hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas, minerales) y las calorías suficientes para satisfacer las necesidades orgánicas particulares, tiende a ser sustituido por el de nutrición funcional, que además de hacer referencia a la capacidad de nutrir se refiere a la potencialidad que tienen algunos alimentos para promocionar la salud, mejorando el bienestar y reduciendo el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades. Tales alimentos son llamados alimentos funcionales y es la respuesta que da la industria alimentaria a los nuevos hábitos que influyen las decisiones de los consumidores: productos fáciles de conservar, más seguros, frescos o mínimamente procesados y desprovistos de conservantes químicos sintéticos (1). El crecimiento exponencial del mercado de los alimentos funcionales se debe al deseo de obtener mejor calidad de vida, a una relación más estrecha entre la alimentación sana y el placer de comer y a un mayor conocimiento de la alimentación saludable y los descubrimientos científicos. Además muchos consumidores optan por versiones más saludables de sus productos favoritos, antes que adaptar sus dietas a las directrices alimentarias (2). El futuro de los alimentos funcionales dependerá, en gran medida, de su eficacia real para reducir el riesgo de enfermedad, su seguridad y su calidad organoléptica (3).

Hay que distinguir entre las diferentes denominaciones que reciben los ingredientes que consumimos en la actualidad. Una breve distinción se hace en la Figura I-1. Los alimentos funcionales no pueden borrar los efectos de una dieta pobre, si no que deben incorporarse en la dieta de forma natural y continua y se deben complementar con una dieta equilibrada y actividad física.

La alimentación funcional como tal tuvo su origen en Japón en la década de los 80, cuando el gobierno nipón, presionado por el gasto sanitario, patrocinó un proyecto nacional a fin de investigar las implicaciones entre la medicina y la alimentación, con el objeto de garantizar un buen nivel de vida a una población con una esperanza de vida cada vez más alta. Esto llevó a la implementación en 1991 de la primera política mundial para la comercialización de alimentos funcionales

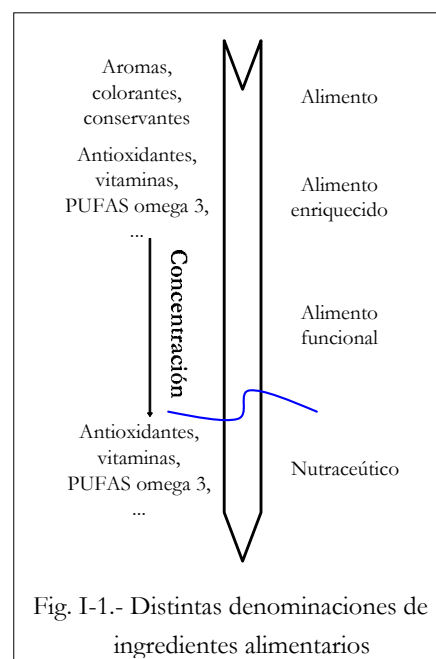


Fig. I-1.- Distintas denominaciones de ingredientes alimentarios

seleccionados, bajo el nombre de “Alimentos para uso sanitario específico” (“Foods for Specified Health Use”, FOSHU).

En Estados Unidos, los alimentos funcionales surgieron de la necesidad de compensar la mala dieta, rica en grasas saturadas y pobre en vitaminas y fibra. La industria de la alimentación funcional está claramente orientada al desarrollo de productos para reducir el riesgo de padecer cáncer y enfermedades coronarias a través del refuerzo del sistema inmune y una reducción de los niveles de colesterol. El consumo de alimentos funcionales está muy extendido en este país estimándose que el 40% de la población los ha incorporado en su dieta.

En Europa, y ante la expansión del mercado de alimentos funcionales, la Unión Europea creó una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSE), con la idea de desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas necesarias para respaldar el desarrollo de productos alimenticios que puedan tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica del organismo y mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo y/o reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. La idea general que surgió de esa Acción Concertada fue que los alimentos funcionales se deberían presentar como alimentos normales, demostrar su efectividad en cantidades que se pueden consumir en una dieta y ser consumidos dentro de un patrón normal de alimentación. Por tanto un alimento funcional podría ser:

- un alimento natural
- un alimento al que se le ha añadido un componente beneficioso/activo
- un alimento al que se le ha eliminado un componente perjudicial mediante medios tecnológicos o biológicos
- un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes
- un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes.

Esta Acción concertada de la UE apoyó el desarrollo de dos tipos de alegaciones de salud:

- de “funcionales de mejora”, asociadas a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y a actividades biológicas que van más allá de su papel establecido en el crecimiento, desarrollo y otras funciones normales del organismo.

- de “reducción de riesgos de enfermedades”, asociadas al consumo de un alimento o de sus componentes para ayudar a reducir el riesgo de padecer una determinada enfermedad o afección.

Sin embargo, a pesar de la expansión a nivel mundial del término alimento funcional no existe una definición unificada por los principales organismos y agencias nacionales e internacionales. De acuerdo con la aproximación adoptada en Europa (4) un alimento se puede considerar “funcional” si demuestra satisfactoriamente que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones concretas del organismo, más allá de sus efectos nutricionales, de forma que dicha influencia es relevante para una mejora en la salud y el bienestar, o bien una reducción del riesgo de padecer una enfermedad (5).

La funcionalidad de los alimentos se debe a los beneficios fisiológicos aportados por sus ingredientes bioactivos y depende de diferentes factores tecnológicos (Figura I-2). Algunos ingredientes bioactivos que se añaden en alimentación son prebióticos, probióticos, lípidos, vitaminas, antioxidantes, minerales y fibras dietéticas como aparecen en la Tabla I-1.

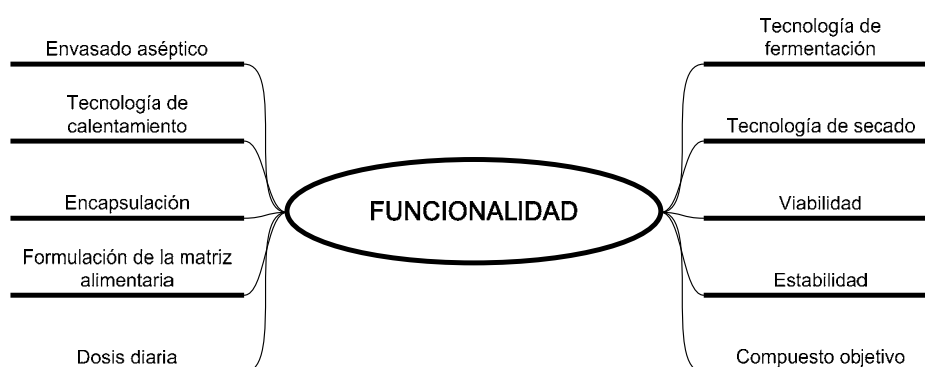


Fig. I-2.- Factores tecnológicos que influyen la funcionalidad de los alimentos funcionales.

La mayoría de alimentos funcionales contienen ingredientes cuyos efectos sobre la salud son conocidos desde hace tiempo.

Tabla I-1. Ingredientes funcionales más importantes.

Tipo de Ingredientes funcionales	Ejemplos de Ingredientes	Efectos en la salud	Ejemplos de productos
Probióticos	Lactobacilos y bifidobacterias	Favorecen el funcionamiento del sistema gastrointestinal y reducen la incidencia y la duración de las diarreas. Mejoran la calidad de la microflora intestinal.	Productos lácteos
Prebióticos	Fructo-oligosacáridos (Hidratos de carbono no absorbibles)	Favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas.	Cereales enriquecidos
Antioxidantes	Vitamina C y E, carotenos, flavonoides y polifenoles. Isoflavonas, lignanos.	Reducen el efecto perjudicial de los radicales libres. Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores.	Frutas y verduras, zumos, bebidas no alcohólicas.
Lípidos	Ácidos grasos insaturados, Omega 3, Ácido Linoleico Conjugado (CLA).	Contribuyen a la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular, el riesgo de ciertos tipos de cáncer y mejoran el desarrollo del tejido nervioso y las funciones visuales. Pueden reducir los procesos inflamatorios. Beneficios en procesos cancerígenos. Lipolíticos, para personas obesas.	Productos lácteos, productos cárnicos, margarinas y aceites, productos de panadería y pastelería.
Vitaminas	Vitamina B6, Vitamina B12, ácido fólico, Vitamina D y Vitamina K. Colina, Biotina y Vitamina E.	Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.	Zumos, bebidas no alcohólicas, alimentos infantiles, productos de panadería y pastelería.
Minerales	Calcio, hierro, magnesio, selenio y zinc.	Reducen el riesgo de osteoporosis y fortalecen el sistema inmune. Calcio: Ayuda al desarrollo de huesos y dientes, interviene en la transmisión del impulso nervioso y los movimientos musculares y puede prevenir la osteoporosis. Hierro: Facilita el transporte de oxígeno en la sangre. Previene la aparición de anemias.	Productos lácteos, zumos, bebidas no alcohólicas, alimentos infantiles.
Fibras dietéticas	Pectinas, gomas y mucílagos (Fibras solubles). Beta-glucanos Celulosa, hemicelulosa y lignina (Fibras insolubles).	Reducción del riesgo de enfermedad coronaria. Disminución de los niveles de colesterol. Mejoran la calidad de la microflora intestinal. Regulan el tránsito intestinal.	Cereales, productos de panadería y pastelería, zumos.

Fuente: SENC 2004 y 2005 y elaboración propia

1.1.1. Legislación

Por el momento, la Unión Europea no reconoce los alimentos funcionales como una categoría específica de alimentos, de modo que tan solo algunos de los alimentos considerados actualmente funcionales podrían incluirse dentro de la normativa europea aplicable a los denominados alimentos dietéticos (Comisión Europea, Propuesta de Reglamento COM (2003) 424, de 16 julio sobre las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos y Directiva 2001/15/CE, de 15 febrero sobre sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial).

Es importante destacar ciertos aspectos a la hora de diseñar un alimento funcional:

- el efecto funcional es distinto del nutritivo;
- debe demostrar satisfactoriamente dicha actividad funcional;
- esta actividad puede consistir en una mejora de las funciones fisiológicas o en una reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad.

Esta definición, si bien es amplia, debe ir acompañada de ciertas premisas, entre las cuales destacan: i) el alimento funcional debe ejercer su función beneficiosa en el organismo cuando se ingiere en cantidades normales de consumo, y ii) debe mantener tanto la estructura como la forma de su alimento análogo no-funcional.

Desde diciembre de 2006, la Unión Europea cuenta con un reglamento regulador de las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los productos alimenticios (Reglamento CE 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos¹), norma que afecta a la comunicación publicitaria y etiquetado de los mismos. La gran aportación de este reglamento desde su entrada en vigor en febrero de 2007, consiste en la obligación de que toda alegación presente en el etiquetado deberá estar provista de la evidencia científica que la justifique. Además, otra novedad de dicho reglamento consiste en la inclusión del “perfil nutricional” como criterio para “regular las circunstancias en que puedan hacerse las declaraciones. Deben basarse en pruebas científicas generalmente aceptadas en lo que se refiere a la relación entre la dieta y la salud. Sin embargo, los perfiles también deben permitir la innovación de los productos, y deben tener en cuenta la variabilidad de los hábitos y tradiciones dietéticos, así como que determinados productos concretos pueden desempeñar un papel importante en el contexto de una dieta global”.

¹ Modificado en lo relativo a su relación con las legislaciones de los estados por Reglamento (CE) n° 107/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y por el Reglamento (CE) n° 109/2008.

Para elaborar los perfiles nutricionales, la Comisión se ha basado en la opinión emitida por Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)².

En España las competencias de cese o rectificación de la publicidad referente a las alegaciones nutricionales son competencia de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición; Ley 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios, B.O.E. 30 de diciembre de 2006).

1.1.1.1. Reglamento CE sobre nuevos alimentos

Gracias a los desarrollos científicos y tecnológicos, el mercado recibe con regularidad nuevos productos. Aun siendo tan variados como nuevos, todos tienen un denominador común: han de someterse a un procedimiento de evaluación y aprobación antes de ser comercializados. En 1997, la UE presentó el actual reglamento sobre Nuevos Alimentos y Nuevos Ingredientes Alimentarios (Reglamento CE 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre alimentos e ingredientes alimentarios nuevos), destinado a evaluar la seguridad de los productos alimentarios más recientes. El texto distingue cinco categorías de productos, en función de la tecnología aplicada o del origen de los alimentos y de sus ingredientes, que antes de 1997 no se habían destinado en Europa al consumo humano en cantidades significativas. Dada la diversidad y el alcance de los denominados “Nuevos Alimentos”, cada caso se estudia individualmente.

Para iniciar el procedimiento, las empresas que deseen comercializar un nuevo producto tendrán que someterlo a las autoridades responsables de la seguridad alimentaria de su país. En cada Estado Miembro de la UE existe un organismo competente en la evaluación de los nuevos productos. Si lo considera oportuno, el Comité puede solicitar información más detallada sobre el producto a aprobar, o someterlo al Comité Toxicológico (COT), al Comité de Asuntos Médicos (COMA), o al Comité Consultivo sobre Liberación en el Medio Ambiente (ACRA). La norma hace especial hincapié en la evaluación del riesgo medioambiental de los alimentos e ingredientes que contienen organismos genéticamente modificados (OMG).

Cuando un producto se somete a evaluación por primera vez en un país de la Unión Europea, éste envía la propuesta a los demás Estados Miembros para obtener su conformidad. En caso de no lograr el consenso, el asunto se traslada al Comité Científico para la Alimentación Humana (SCF), el organismo superior en materia de seguridad alimentaria designado por la Comisión Europea. Los expertos independientes que lo integran examinan los aspectos científicos y técnicos relativos a la salud y la seguridad

² EFSA: The setting of nutrient profiles for foods bearing nutrition and health claims pursuant to Article 4 of the Regulation (EC) No 1924/2006 - Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (publicado en febrero de 2009).

alimentaria, y estudian en particular lo concerniente a la toxicidad e higiene de toda la cadena de producción.

El hecho de que la aprobación de todo nuevo producto alimenticio se someta a varios organismos de seguridad independientes pretende garantizar su calidad e inocuidad. Los interesados pueden consultar los sumarios de los debates sobre Nuevos Alimentos de estos comités en la página web de la Dirección General para la “Política de los Consumidores y Protección de la Salud de los Consumidores”, de la Comisión Europea: <http://europa.eu.int/comm/dg24>.

El interés fundamental de la presente memoria se ha centrado en un grupo específico de ingredientes funcionales, los carbohidratos prebióticos y concretamente en tres de ellos: la lactulosa, la tagatosa y los galactooligosacáridos.

1.2. Carbohidratos prebióticos

Dentro de la categoría de alimentos funcionales se encuentran los alimentos con propiedades prebióticas que ejercen su efecto principalmente en la microflora gastrointestinal modificando positivamente procesos fisiológicos en la nutrición humana y aportando un beneficio adicional al consumidor. El término prebiótico, introducido en 1995, se refiere a “un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon” (6).

Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico debe cumplir según Gibson (7) los siguientes requisitos:

1. No debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte anterior del tracto gastrointestinal.
2. Constituir un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias beneficiosas del colon, estimulando su crecimiento y/o metabolismo.
3. Modificar la composición de la flora del colon, facilitando el desarrollo de especies beneficiosas.
4. Inducir efectos en lumen o sistémicos que sean beneficiosos para la salud del individuo que los consuma.

Aunque la utilización de carbohidratos prebióticos como ingredientes en alimentos es conocido desde 1957 (8), en los últimos años se ha producido un aumento del interés en el uso de carbohidratos como reguladores de la composición de la flora intestinal y para mejorar la actividad del tracto gastrointestinal, tal como se ha descrito en diversos estudios

(9-12). Una óptima flora intestinal establece una barrera efectiva a la invasión y colonización del intestino por parte de los patógenos, produce un abanico de sustratos metabólicos que son utilizados por el huésped (por ejemplo vitaminas y ácidos grasos de cadena corta) y estimula el sistema inmunitario de una manera no inflamatoria. Numerosos estudios han demostrado que la capacidad de las bifidobacterias y los lactobacilos para fermentar a los carbohidratos prebióticos es específica tanto para las cepas como para el sustrato (13). Sin embargo, no está claro qué tipo de carbohidratos prebióticos son los sustratos más adecuados para el crecimiento selectivo de cada cepa. Para ello se han realizado diferentes planteamientos para determinar la actividad funcional de los prebióticos en fermentaciones *in vitro* (14-18).

La eficacia de los prebióticos está ligada a su capacidad de resistir la digestión en el intestino delgado y alcanzar el intestino grueso, donde serían utilizados selectivamente por un grupo restringido de microorganismos, fundamentalmente bifidobacterias y lactobacilos. La Tabla I-2 muestra los carbohidratos que pueden cumplir estos requisitos y que son objeto de investigación. En la actualidad la demostración de los efectos prebióticos requiere un intensivo análisis cualitativo y cuantitativo de la flora del colon y de su modulación mediante el tratamiento prebiótico. Para ello es necesario el desarrollo de nuevos métodos que permitan detectar leves cambios en la composición de dicha flora y correlacionarlos con los beneficios para la salud. Asimismo es imprescindible el desarrollo de procesos que permitan el aislamiento selectivo de carbohidratos prebióticos para poder asociar la actividad a un único prebiótico.

Tabla I-2. Composición química y características de carbohidratos prebióticos y prebióticos potenciales.

Componente	Composición	GP*
Inulina	β (2-1) fructano	2-65
Fructooligosacáridos	β (2-1) fructano	2-8
Galactooligosacáridos	Oligolactosa (85%)	2-10
Oligosacáridos de soja	Mezcla de rafinosa y estaquiosa	2-3
Xilooligosacáridos	Xilosa con uniones β (1-4)	2-4
Isomaltooligosacáridos	Mezcla de oligómeros de glucosa con uniones α (1-6)	2-8
Oligosacáridos transgalactosilados	6' galactosil-lactosa	2-8
Lactulosa	Galactosil β (1-4) fructosa	

GP*= grado de polimerización

Entre los beneficios que se derivan de su uso se puede destacar un aumento de la protección frente a enfermedades alimentarias y alergias (19), regulación del balance hormonal y reducción del pH intestinal (20), posible disminución del riesgo a padecer cáncer colorrectal (21), posible disminución en el nivel de colesterol en sangre (22-24), mejora de la flora intestinal en bebés (22), mejora del sistema inmunitario (23), efecto laxante (24), potenciación de los efectos de los probióticos y estimulación de la absorción de calcio por el colon (25).

Como consecuencia de las investigaciones realizadas, hoy día hay disponibles comercialmente diferentes tipos de carbohidratos prebióticos tales como, galactooligosacáridos, rafinosa, tagatosa, isomaltooligosacáridos, xilooligosacáridos, lactosacarosa, lactulosa, fructooligosacáridos etc. La mayor parte de ellos aprobados como "Foods for Specific Health Use (FOSHU)".

1.2.1. Lactulosa

La lactulosa (4-o- β -D-galactopyranosyl-D-fructosa; ver Figura I-3 donde se muestra las estructuras bidimensionales y tridimensionales de la lactulosa y su isómero, la lactosa) fue el primer carbohidrato utilizado como ingrediente prebiótico en alimentos. Se trata de un disacárido semisintético obtenido a partir de la isomerización alcalina de la lactosa. Es muy soluble en agua y es más dulce que la lactosa pero menos que la fructosa (26).

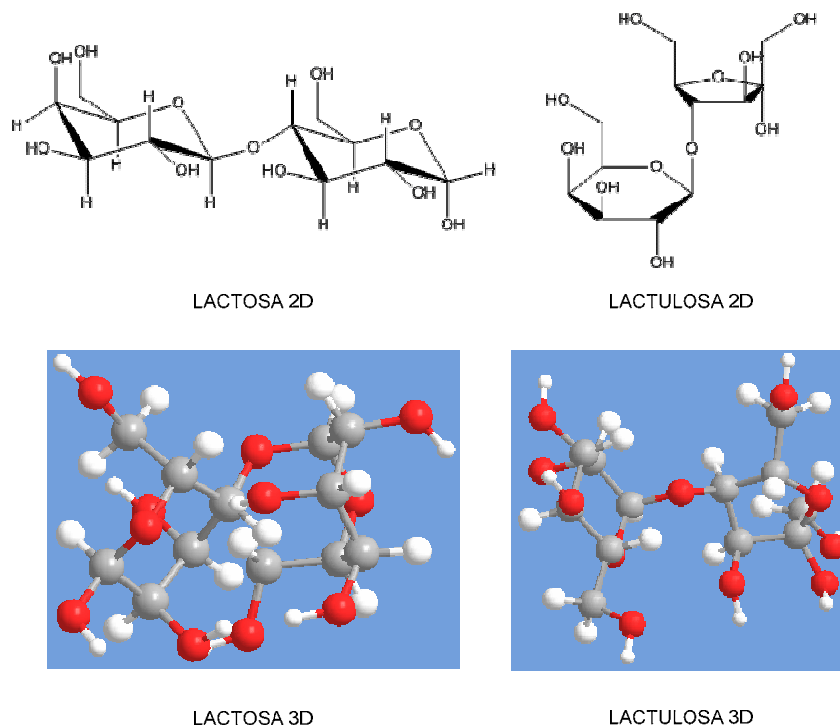


Fig. I-3.- Representación bidimensional y tridimensional de la lactulosa y la lactosa

Su capacidad para estimular las bifidobacterias presentes en el tracto gastrointestinal es conocida desde los primeros trabajos de Petuely (8). La lactulosa presenta baja absorción en el intestino delgado y llega al intestino grueso donde es degradada por la flora microbiana (según se describe en la Figura I-4), de la misma manera que los oligosacáridos de la leche materna (27).

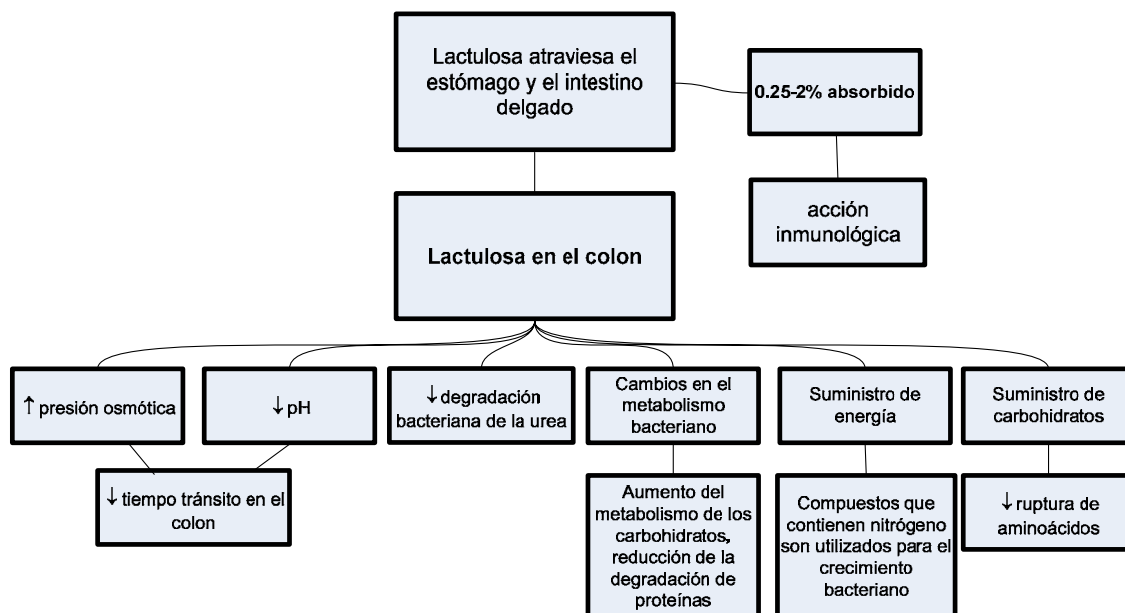


Fig. I-4.- Mecanismo principal de acción de la lactulosa (28).

Su obtención fue descrita por primera vez en 1929 por Montgomery y Hudson (29). Estos autores trataron una solución acuosa de lactosa con hidróxido de calcio y observaron la isomerización del carbohidrato. Desde entonces hasta la fecha han sido innumerables los trabajos sobre obtención de lactulosa empleando diferentes catalizadores pero todos ellos se han basado en la isomerización de la lactosa en medio básico. Ejemplos de los diferentes catalizadores empleados son: hidróxido cálcico (29), hidróxido sódico (30-33), carbonato sódico (30) y óxido de magnesio (31).

Los métodos actuales de obtención de lactulosa de alta pureza son caros, ya que necesitan un paso de separación y otro de purificación. La principal dificultad reside en el paso de purificación de la lactulosa, ya que durante la isomerización, parte de la lactulosa se degrada dando galactosa, tagatosa (32), epilactosa, ácidos sacarínicos y compuestos de bajo peso molecular que posteriormente se polimerizan originando productos coloreados. Así, la producción industrial de lactulosa resulta cara debido principalmente a este paso (33). Muchos catalizadores, como los descritos anteriormente, se han empleado en la producción de lactulosa. En todos estos casos, sin embargo, el rendimiento de la reacción es bajo debido a numerosas reacciones de degradación que dan lugar a un gran número de

compuestos que dificultan el aislamiento de la lactulosa del medio de reacción. Para obtener lactulosa purificada, se desioniza la mezcla de reacción mediante el tratamiento con resinas de intercambio iónico, se concentra y la lactosa que no ha reaccionado cristaliza, obteniéndose así una solución de lactulosa con algunas impurezas de lactosa, epilactosa y galactosa.

Existen otros procedimientos que evitan la degradación de la lactulosa utilizando aluminatos (34, 39-41) o boratos (34-38) como catalizadores y estabilizadores de la lactulosa formada. Estos complejos evitan la degradación y se llegan a conseguir rendimientos próximos al 80%. La principal dificultad de este procedimiento consiste en la total eliminación de los boratos y los aluminatos.

Otros procedimientos de purificación de la lactulosa están basados en las diferencias de solubilidad de la lactosa y la lactulosa en alcoholes (39). La solubilidad de ambos disacáridos en alcoholes aumenta con el contenido de humedad y disminuye con el aumento del peso molecular del alcohol. En todas las condiciones estudiadas, la solubilidad de la lactulosa es más de diez veces superior a la de la lactosa (40). A partir de mezclas equimoleculares de lactosa y lactulosa es posible obtener lactulosa con una pureza superior al 90% mediante el tratamiento con alcoholes. También se ha investigado el uso de sulfitos y fosfatos como catalizadores de la isomerización de lactosa a lactulosa, que permiten el empleo de altas temperaturas y concentraciones de lactosa (41). Otros métodos empleados llevan a cabo la isomerización de la lactosa utilizando sepiolitas, donde se sustituyen parte de los Mg^{2+} por otros iones alcalinos (Li^+ , Na^+ , K^+ ó Cs^+), mejorando así su actividad (42, 43). También se ha intentado obtener lactulosa mediante resinas de intercambio iónico, con lo que se evita el empleo de catalizadores y el costoso paso de purificación (44).

La lactulosa, que es el ingrediente prebiótico de mayor consumo en el mundo (45), se comercializa en soluciones acuosas con distintos grados de pureza, en polvo y en forma cristalina, tanto anhidra como hidratada, especialmente en forma trihidratada (28).

Los productos farmacéuticos consistentes en soluciones de lactulosa en elevadas concentraciones se comercializan en todo el mundo para el tratamiento del estreñimiento (46) y de la hiperamonemia. La lactulosa también ha mostrado su eficacia en el tratamiento de la encefalopatía hepática (47-49), en el incremento de la absorción de calcio (50), en el tratamiento de infecciones intestinales (51), así como su actividad antimicrobiana e hipolipidémica (52-54). Como se ha mencionado anteriormente, la lactulosa es un disacárido que se obtiene por isomerización de la lactosa, componente que se encuentra en alta concentración en la leche (4.5%) (55) y en el lactosuero (38). El porcentaje medio de lactosa en el suero y en la leche es del 4.5%. Esta materia prima que se emplea para la producción de lactulosa está disponible en grandes cantidades y a bajo precio como subproducto de la industria quesera y permeado de quesería (alrededor de 72 millones de toneladas al año (56)) y a pesar de sus múltiples usos desarrollados en los últimos años

como ingredientes en la alimentación humana y animal (57, 58) la eliminación del suero es todavía uno de los mayores problemas de la industria lechera (59, 60).

1.2.2. Tagatosa

La tagatosa (ver Figura I-5 donde se muestran las estructuras bidimensionales y tridimensionales de la tagatosa y su isómero, la galactosa) es un monosacárido, isómero de la galactosa, que de forma natural está presente en algunos líquenes (61), también se forma en pequeñas cantidades a partir de la lactosa durante el tratamiento térmico de la leche (64-66), en el cacao caliente, en algunas variedades de quesos, yogures y otros productos lácteos (62). Aunque tiene, aproximadamente, el mismo dulzor y volumen (bulk) que la sacarosa, la tagatosa únicamente proporciona 1.5 cal/g en comparación con las 4 cal/g que proporciona la sacarosa (63-65). La tagatosa no es fermentada por la microflora bucal por lo que no está implicada en la formación de caries dentales (66). Además, la tagatosa no tiene efecto laxante como otros polioles empleados para sustituir azúcares (67-69). Estas propiedades físicas aseguran un fácil empleo en alimentos funcionales, bebidas, etc. En Estados Unidos ha recibido la consideración de alimento seguro (GRAS, del inglés Generally Recognized As Safe), el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ha recomendado su uso como aditivo alimentario (70-72) y su uso en alimentos y bebidas ha sido aprobado en varios países (72). El 14 de Diciembre de 2005, la tagatosa fue aprobada como Novel Food Ingredient en la Unión Europea sin restricción de uso.

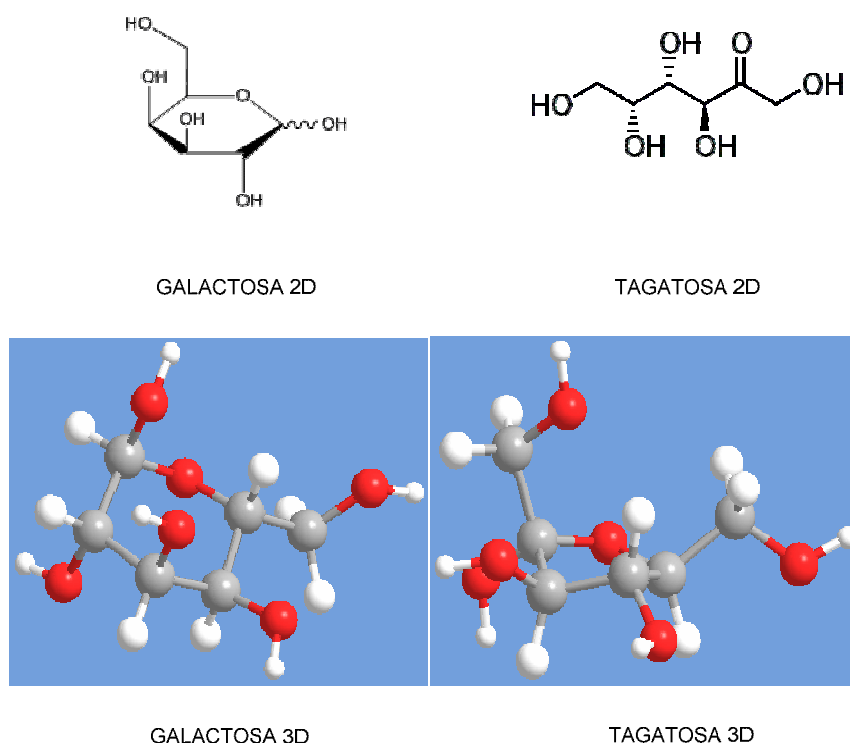


Fig. I-5. - Representación bidimensional y tridimensional de la galactosa y la tagatosa.

La tagatosa ingerida se absorbe de forma incompleta en el intestino delgado, entre un 15 y un 20% y consigue llegar al colon donde estimula el crecimiento de la flora bacteriana beneficiosa para el organismo (67). La novedad de la tagatosa es que la fermentación que induce produce un perfil único de ácidos grasos de cadena corta, con una elevada proporción de butirato (72, 78, 79). Además de su efecto prebiótico, entre sus beneficios destaca su mínimo impacto en la glucosa sanguínea y la reducción de los síntomas asociados con la diabetes tipo 2, la anemia y la hemofilia (63, 66, 73-76); se emplea para combatir la obesidad (77, 78), es útil en la lucha contra el cáncer de colon (71), aumenta el colesterol unido a la lipoproteína HDL (también conocido como colesterol bueno), posee efecto antiglicémico (66, 76), propiedades anti placa, anti cariogénicas, anti halitosis y anti biofilm (72, 79, 86), mejora la tolerancia de los órganos trasplantados (79), mejora del sabor (80) y mejora del desarrollo fetal (81).

La tagatosa puede obtenerse a partir de la galactosa mediante isomerización de ésta en presencia de catalizadores básicos como el hidróxido cálcico (82) y aluminatos (83). Al igual que en el caso de la lactulosa, la purificación a partir de la mezcla de reacción resultante es la etapa más costosa del proceso de obtención (Figuras I-6 y I-7).

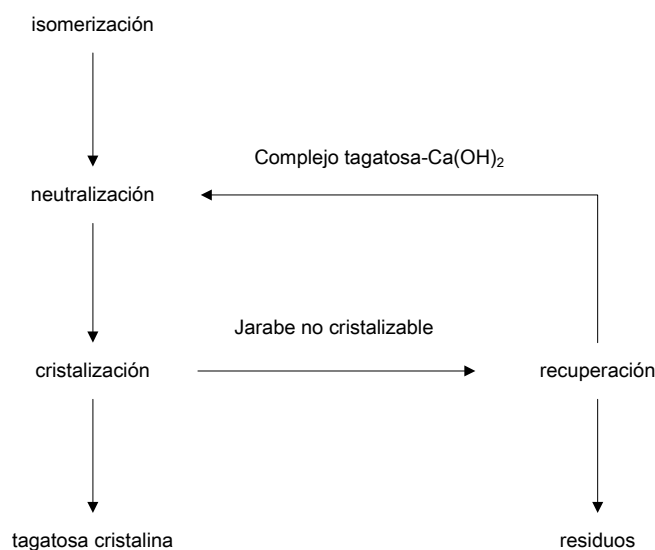


Fig. I-6.-Pasos de la vía química

Los métodos químicos presentan desventajas, ya que incluyen procesos de purificación complejos, la formación de subproductos debido a las condiciones alcalinas de la reacción y la formación de residuos químicos (71). Por ello, la investigación para la producción biológica de tagatosa (Ver Fig. I-7) a partir de galactosa usando L-arabinosa isomerasa está recibiendo cada vez más atención (84). Actualmente existen procesos, viables comercialmente, basados en el empleo de la L-arabinosa isomerasa (85-92). Sin embargo, a pesar de ser procesos comercialmente viables aún presentan problemas que deben ser resueltos, como el precio de las enzimas, la inmovilización y la vida útil del

producto (75). Además, aunque el rendimiento que se alcanza con la bioconversión es elevado, la eliminación de la galactosa remanente sigue siendo necesaria y es donde radica el principal escollo para la producción de tagatosa a precios razonables. Recientes investigaciones han conseguido aumentar el rendimiento de la conversión empleando L-arabinosa isomerasa de microorganismos termofílicos o hipertermofílicos y añadiendo boratos a la reacción llevada a cabo a altas temperaturas (93). De esta manera se forma el complejo tagatosa/borato que cambia el equilibrio de la reacción favoreciendo la formación de tagatosa (94). Otra línea de investigación propuesta para la producción de tagatosa es a partir de fructosa vía psicosa según el proceso de Izumoring (95). Sin embargo, el rendimiento de este proceso es aún muy bajo y necesita de mayor investigación. Una posible solución a este bajo rendimiento parece ser emplear cepas de *Mucoraceae Fungi* como ya se hace en la producción industrial de D-psicosa a partir de D-fructosa (96).

A pesar de los avances en el conocimiento científico, hasta estos momentos la producción industrial de tagatosa se sigue basando en la isomerización química de la galactosa (82, 97).

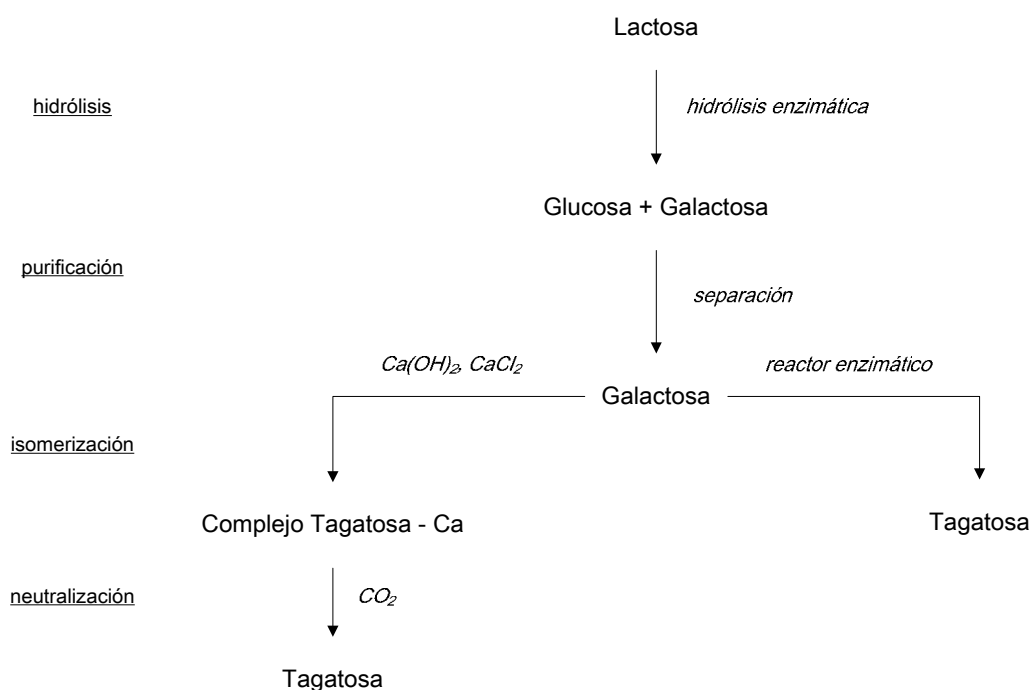


Fig. I-7.-Diagrama esquemático de los procesos químicos y enzimáticos para la producción de tagatosa.

1.2.3. *Galactooligosacáridos*

Según la terminología que indica la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry; 1982) los oligosacáridos se consideran como compuestos de 2 a 10 unidades de monosacáridos y los polisacáridos compuestos de más de 10 unidades de monosacáridos, aunque no exista ninguna razón fisiológica o química que justifique esta división (98). Al mismo tiempo, según sus propiedades fisiológicas se pueden clasificar como digeribles o no digeribles (o no disponibles). Los oligosacáridos no digeribles muestran varios efectos fisiológicos y nutricionales. Las principales categorías de oligosacáridos actualmente disponibles, o en desarrollo, incluyen carbohidratos en los que la unidad de monosacárido es fructosa, galactosa, glucosa y/o xilosa (99, 100).

Los oligosacáridos no digeribles (OND) se encuentran en diferentes alimentos de forma natural, sin embargo también pueden producirse mediante diferentes reacciones químicas en el laboratorio. En la Figura I-8 se muestran los procesos de producción de los oligosacáridos.

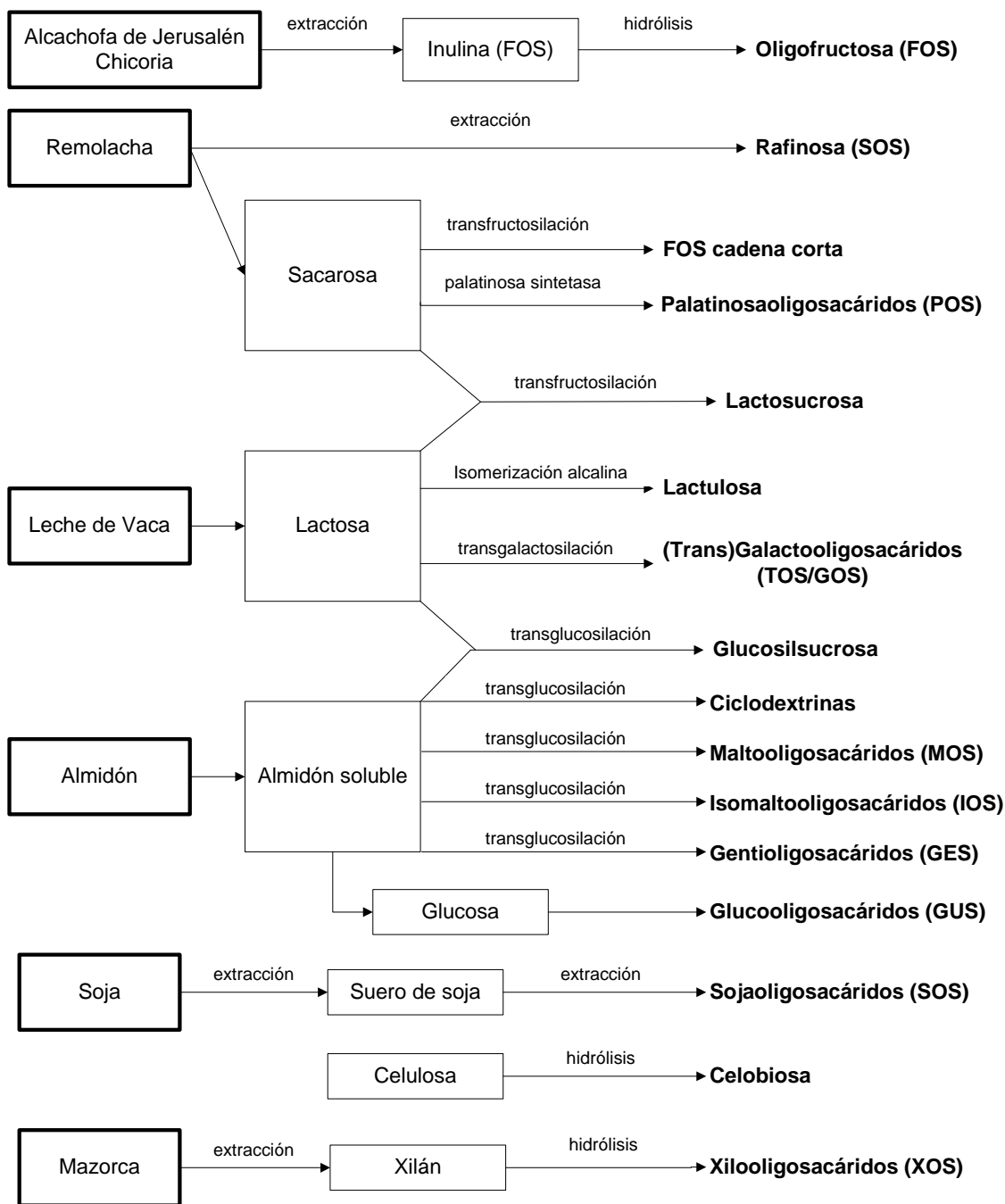


Fig. I-8.-Esquema que representa los procesos de producción de los oligosacáridos.

Los galactooligosacáridos (GOS) son oligosacáridos no digeribles, compuestos entre 2 y 20 moléculas de galactosa y una de glucosa (101), principalmente disacáridos, trisacáridos y tetrasacáridos sintetizados a partir de lactosa, vía transgalactosilación enzimática catalizada por β -galactosidasas (102), aunque también se encuentran de forma natural. Los GOS estimulan selectivamente el crecimiento de bifidobacterias en la parte baja del intestino humano. Este incremento de bifidobacterias en el intestino va unido, normalmente, a la reducción de bacterias potencialmente peligrosas como *Clostridia* (103).

Como ocurría con los anteriores carbohidratos prebióticos mencionados, lactulosa y tagatosa, la materia prima para obtener GOS es el suero de quesería, abundante y de bajo coste. Y al igual que ocurría con la lactulosa y la tagatosa también se pueden producir por vía enzimática. La síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa usando β -galactosidasas (E.C. 3.2.1.23) ha sido ampliamente estudiada (112-119) y se conoce el efecto de distintos factores como la temperatura y el pH (104-106), el uso de disolventes orgánicos (107, 108), concentración del enzima y la fuente de obtención, concentración de lactosa (109) o la inmovilización en diferentes matrices (110). Sin embargo el rendimiento de la formación de GOS es aún bajo. En cuanto al origen de la enzima se sabe que la β -galactosidasa produce diferentes tamaños o tipos de GOS, la enzima de *Bacillus circulans* produce GOS-2 (disacáridos) y GOS-3 (trisacáridos) y en menor cantidad GOS-4 (tetrasacáridos) y GOS-5 (pentasacáridos); la enzima de *Kluyveromyces spp.* mayor GOS-2 y algunos GOS-3, mientras que la de *Aspergillus oryzae* produce mayor cantidad de GOS-3 y una pequeña cantidad de GOS-4, siendo esta última muy utilizada en alimentos por su bajo coste (111, 112). Se sabe además que existen muchas otras fuentes enzimáticas que no han sido aprobadas todavía para uso alimentario, siendo en ocasiones muy costosas o existiendo en cantidades insuficientes (113, 114).

El tipo de control que tiene mayor importancia durante la reacción es el cinético, debido a las características propias de la enzima, la cual posee mucha mayor afinidad por un grupo hidroxilo de un azúcar no protegido (lactosa), el que se unirá al donador glicósilo formado previamente (complejo galactosil-enzima, reacción de quimioselectividad); aunque la selectividad no es absoluta ni predecible, la síntesis controlada cinéticamente es más exitosa que la controlada termodinámicamente, ya que en esta última, para cambiar la dirección de la reacción hacia la síntesis se deberá recurrir al uso de solventes apolares donde los sustratos y productos de la reacción son escasamente solubles (115).

En cuanto a la temperatura de reacción, la cantidad de enzima a utilizar y el valor de pH de reacción, son parámetros que no mejoran la cantidad de GOS que se produce en la reacción, pero que influyen en el aumento de la velocidad de reacción; por consiguiente se producirá un tipo de GOS a una conversión de lactosa definida en el menor tiempo posible. Se debe tener en cuenta además, que para una conversión de lactosa entre el 40 y 60% se llegaría a obtener la máxima cantidad posible de GOS debido a que posteriormente la reacción de transgalactosilación disminuiría comenzando la hidrólisis de los oligosacáridos formados (116, 117). Se ha demostrado que la cantidad de GOS generado estará relacionado directamente con la cantidad de lactosa presente al inicio de la reacción de transgalactosilación y se han observado que concentraciones iguales o superiores al 20% mejorarían la producción de GOS, alcanzándose entre el 30 y 40%, correspondiendo al porcentaje de GOS producido a partir de una cantidad de lactosa inicial (118, 119).

Actualmente las investigaciones se centran en la mejora de este rendimiento, por ejemplo empleando β -galactosidasas termoestables o inmovilizadas (120, 121) y también en

la formación de trisacáridos y en la formación de oligosacáridos de mayor peso molecular (113, 131, 132).

Las reacciones de síntesis enzimática no sólo producen GOS, sino que además se obtienen grandes cantidades de glucosa, galactosa y lactosa sin reaccionar que no tienen propiedades prebióticas y por lo tanto van a ser absorbidos en el intestino grueso. Su presencia no es deseable, especialmente, cuando hay restricciones alimentarias prescritas (diabetes, intolerancia a la lactosa,...). Esta es la razón para la isomerización posterior de la mezcla obtenida en la síntesis enzimática de los GOS, porque las aldosas pueden ser isomerizadas en condiciones básicas y es posible modificar sus propiedades para dar lugar a sus correspondientes cetosas con diferentes propiedades o características.

En medio básico, los azúcares se enolizan fácilmente, sufriendo una transformación que conlleva la epimerización tanto de aldosas como de cetosas, así como la isomerización aldosa-cetosa. La presencia de bases favorece esta reacción aunque a una velocidad mucho más lenta. Esta isomerización se conoce como de Lobry de Bruyn-van Ekenstein (122) y se emplea para la preparación de carbohidratos no disponibles de forma natural.

La mayor parte de los procesos de isomerización causan un gran nivel de productos indeseables, difíciles de quitar. En la producción a nivel industrial, los productos de degradación deberían evitarse o mantenerse por lo menos al mínimo. La presencia de monosacáridos y lactosa es especialmente indeseable en propósitos médicos necesitando una etapa de lavado, posible pero complicada. Esta etapa puede evitarse si el uso de dicho sirope es como aditivo alimentario (123).

Aluminatos (34, 39, 40, 146) y boratos (34-38) facilitan la reacción con una producción mínima de reacciones secundarias y dan lugar a rendimientos aceptables, eliminando del equilibrio de la mezcla de reacción en forma de un complejo. Sin embargo, la utilización de estos catalizadores no es del todo satisfactoria a nivel industrial debido a la dificultad de eliminar los aluminatos y los boratos. Además, un gran exceso de catalizador es necesario para obtener buenos rendimientos. En el caso de los aluminatos, por ejemplo, una relación molar de aluminato-lactosa superior a 2 puede dar lugar a un mayor grado de conversión, pero este exceso de aluminato puede ser difícil de eliminar del medio. El efecto de la temperatura también influye en la conversión, pero dicho efecto parece ser menor que la cantidad de catalizador empleado (38).

Hicks *et al.* (124, 125) consiguieron eliminar el ácido bórico empleado como catalizador de la mezcla de reacción y reciclarlo empleando una resina comercial, que

contenía (covalentemente unido) grupos funcionales 1-deoxy-1-metilamino-D-glicitol. Otros estudios para la eliminación del ácido bórico emplearon distintas fases de cristalización, pasteurización y purificaciones empleando resinas (148-150). Para la eliminación del medio de los aluminatos empleados como catalizadores Carobbi e Innocenti, U.S. Patent N° 4957564 (126) emplearon un paso de centrifugación seguido de un tratamiento con membrana.

Los galactooligosacáridos están recibiendo mucha más atención, tanto industrial como científica, desde que han sido reconocidos como prebióticos (18, 45, 110). Estas características son atribuidas principalmente a los 4'- y 6'-galactosil-lactosa (GOS-3) y a algunos oligosacáridos de peso molecular mayor (GOS-4 y GOS-5) debido a que se ha demostrado que son metabolizados completamente por la flora microbiana presente en el colon (45, 127, 128). La formación de GOS durante la hidrólisis enzimática de la lactosa ha sido intensamente estudiada. En la industria alimentaria el proceso más ampliamente utilizado para la síntesis enzimática de GOS es el discontinuo, el cual utiliza la enzima inmovilizada en suspensión, en condiciones estériles y que permiten un fácil control del proceso. En cuanto a procesos continuos, se pueden obtener productos de elevada pureza, pero existe la desventaja en cuanto a la dificultad en la limpieza del reactor debido al uso de concentraciones altas de sustrato.

Se ha determinado, que el tipo de inmovilización influye directamente en el comportamiento de esta enzima en particular; en un estudio desarrollado por Gaur *et al.* (110) se demostró que la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* bajo la forma de agregado entrecruzado poseía una marcada tendencia a la hidrólisis, no observándose esto con la inmovilización covalente en quitosano.

Los GOS son cruciales como aditivos alimentarios con fines saludables, como la prevención de la diarrea y el estreñimiento, disminución del colesterol y la presión sanguínea y la prevención del cáncer de colon (45, 129-133). A pesar de su elevada demanda, no se ha conseguido desarrollar todavía un proceso de producción económicamente rentable. Los GOS son producidos a gran escala a partir de altas concentraciones de lactosa, extraída de la leche, y especialmente del suero de quesería (la misma materia prima que para obtener lactulosa y tagatosa). De esa transgalactosilación se obtienen principalmente de trisacáridos a hexasacáridos. Sin embargo, estos GOS se comercializan como mezclas de carbohidratos que incluyen diferentes grados de polimerización, entre ellos glucosa, galactosa y lactosa sin reaccionar (133), que no tienen actividad prebiótica y aumentan el valor calórico del producto. La composición de esta mezcla depende del enzima empleado y las condiciones de la reacción (45, 120, 128, 134-137).

Los GOS se emplean en bebidas, mermeladas, leche en polvo para bebés, repostería, productos de panadería, yogures y postres lácteos (132, 138, 139). Los GOS han sido

reconocidos como un aditivo alimentario GRAS (Generally Recognized as Safe) debido a que son componentes de la leche materna y yogures tradicionales, y son producidos de la lactosa ingerida por las bacterias residentes en el intestino. Según estudios realizados no se ha demostrado ninguna toxicidad ni mutagenicidad. El único efecto adverso conocido hasta ahora es la diarrea transitoria que ocurre cuando se consume un exceso de GOS; la cantidad de GOS que no induce este tipo de diarrea es de aproximadamente 0,3-0,4 g/kg de peso corporal, o cerca de 20 g por persona (45).

En la actualidad existen productos comerciales en forma de sólido o líquido que contienen GOS en su formulación, siendo la gran mayoría producidos en Japón y algunos en Holanda, a partir de lactosa como sustrato (99, 140):

- Snow Brand F-plus, alimento para bebés, producido por Snow Brand Milk Products.
- Fiber & Oligo, refresco producido por Wakodo.
- Be-feel, Oligomate 55 y TOS-100; derivados lácteos producidos por Yakult Honsha.
- C-100 y Seni & Oligo, bebida producida por Takeda.
- Umer, producto lácteo fermentado producido por Coberco/Netherlands.
- Elix'or, Vivinal, TOS-Syrup, sólidos y bebidas producidas por Borculo Whey Products,
- Netherlands, Domo Ingredients/Friesland.

Estos productos tienen alta pureza en cuanto a su contenido. Los GOS presentes suponen un promedio entre el 55 al 60%, la lactosa un 20%, la glucosa un 20% y la galactosa entre un 1 a un 5% (141). Dentro de este contenido en GOS predominan los 4' galactosil-lactosa (GOS-3) incluyendo algunos disacáridos no lactosados como alolactosa y galactobiosa; estos productos son relativamente dulces, teniendo un equivalente al 35% del dulzor de la sacarosa. Las soluciones de Elix'or y Oligomate 55 son ligeramente más viscosas que un jarabe de fructosa (HFCS) y tienen una presión osmótica similar a la solución de sacarosa a igual concentración (45).

El precio de mercado para los GOS es entre 10 y 12 veces superior al de la lactosa comestible (Valero y Yang 2006). El tamaño del mercado global actual es aproximadamente de 20.000 a 22.000 toneladas por año con el aumento anual mayor de todos los derivados de la lactosa (10 a 20%) (142) y un precio estimado de entre 5.000 y 10.000 dólares/tonelada (143).

La investigación actual está centrada en la manipulación de enzimas para conseguir un mayor rendimiento (limitado actualmente al 50-60%) y mejor especificidad de la síntesis; así como conseguir la separación y purificación de los compuestos de la mezcla obtenidos a partir de los productos de reacción. Los métodos actuales, como ya se ha mencionado, emplean lactosa como producto de partida antes que permeado de suero, ya que se obtienen mejores rendimientos y un uso más eficiente de los enzimas. Sin embargo, los minerales remanentes interfieren en el empleo de mayores concentraciones de lactosa y en la purificación de los GOS de la lactosa residual y de los monosacáridos formados en la reacción de hidrólisis (144).

1.3. Fluidos Supercríticos

La importancia y atención que están recibiendo las tecnologías medioambientalmente limpias ha aumentado considerablemente en los últimos años. Entre ellas destaca la tecnología de extracción por fluidos supercríticos que permite la sustitución de los disolventes tradicionales por otros más respetuosos con el medio ambiente. La tecnología de extracción por fluidos supercríticos usa el poder de disolución de ciertos compuestos bajo determinadas condiciones de presión y temperatura. Se caracteriza también por su versatilidad, que permite llevar a cabo procesos que incluyen operaciones de extracción, fraccionamiento, reacción y purificación, todo ello en línea, en continuo y en medio supercrítico.

1.3.1. Generalidades sobre los fluidos supercríticos

Los estados de agregación de la materia que se conocen actualmente son cinco: sólido, líquido, gas, plasma y condensado de Bose-Einstein. Un fluido supercrítico es un cuasi-estado con propiedades intermedias entre líquidos y gases, como se puede apreciar en la Tabla I-3.

Tabla I-3. Densidad, viscosidad y difusividad de diferentes fluidos tipo.

	Densidad (g/ml)	Viscosidad (g/cm×s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
Líquido	1	10 ⁻²	10 ⁻⁶
Fluido supercrítico	0,2-0,9	10 ⁻⁴	10 ⁻³

En un diagrama de fases clásico como el de la Figura I-9, las curvas de fusión, sublimación y vaporización muestran las zonas de coexistencia de dos fases. Tan solo hay un punto de coexistencia de tres estados, el llamado punto triple (PT). El cambio de estado se asocia a un cambio brusco de densidad y, para que se produzca, es necesario un aporte

extra de energía denominado entalpía de cambio de estado. Pero por encima del punto crítico (PC) este cambio de densidad no se produce, por tanto, se podría definir este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar; y por ende un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por encima de dicho punto .

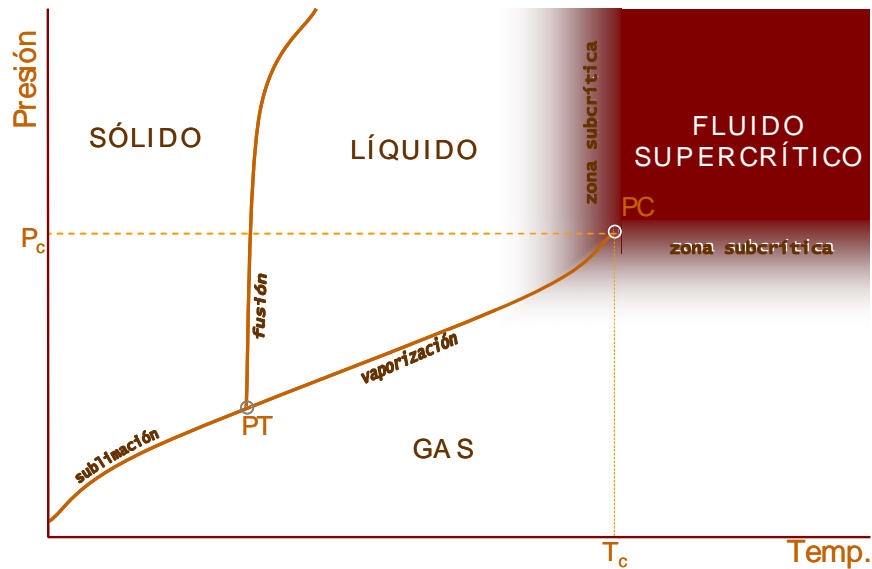


Fig. I-9.-Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT: punto triple, PC: punto crítico, P_c : presión crítica, T_c : temperatura crítica

El punto crítico fue definido por primera vez en 1822 por el Barón Charles Cagniard de la Tour al observar que si un gas se calienta por encima de cierta temperatura (T_c), por más que se comprima éste no alcanza el estado líquido tal como aparece en la sucesión de imágenes de la Figura I-10:

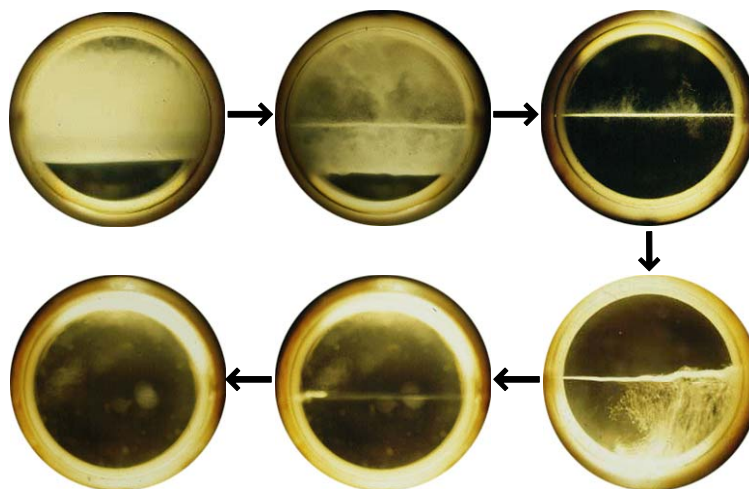


Fig. I-10.-Desaparición de las fases en el punto crítico.

Tanto el punto triple como el punto crítico son característicos de cada sustancia. En la Tabla I-4 se pueden ver las condiciones de presión y temperatura que definen el punto crítico de las sustancias más estudiadas.

Tabla I-4.- Propiedades críticas de las sustancias más comúnmente empleadas en condiciones supercríticas (145, 146)

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Presión crítica (bar)	Temperatura crítica (°C)	Densidad crítica (g/ml)
Dióxido de carbono	44.01	72.0	31.1	0.47
Agua	18.02	214.8	374.2	0.35
Amoniaco	17.03	109.8	132.5	0.23
Argón	39.95	48.6	-122.4	0.73
Acetona	58.08	47.0	235.0	0.28
Etanol	46.07	72.0	243.4	0.28
Metanol	32.04	78.9	239.0	0.27
Metano	16.04	46.0	-82.6	0.16
Etano	30.07	47.6	32.3	0.20
n-Propano	44.10	42.4	96.7	0.22
n-Butano	58.12	70.6	152.0	0.23
n-Pentano	72.15	32.9	196.0	0.23
n-Hexano	86.16	30.1	234.2	0.23
Dimetiléter	46.07	52.6	126.2	0.26
Dietiléter	74.12	63.8	193.6	0.27
Piridina	79.10	56.3	347.0	0.31
Trifluoruro de metano	70.00	47.5	26.0	0.52
Clorotrifluoruro de metano	104.00	39.5	28.9	0.58
Dióxido de nitrógeno	46.10	72.7	36.6	0.46
Hexafluoruro de azufre	146.00	38.2	45.7	0.73
Etileno	28.05	50.4	9.2	0.21
Propileno	42.08	46.0	91.7	0.23

El punto crítico posee diversas propiedades muy peculiares:

- No existe interfase gas-líquido.
- La compresibilidad isotérmica se hace infinitamente positiva.
- El coeficiente de expansión térmica es infinito y positivo.
- La entalpía de vaporización es cero.

- Si la densidad se mantiene constante, e igual a la densidad crítica, la capacidad calorífica a volumen constante tiende al infinito.

Al igual que ocurre con el punto crítico, la región supercrítica también tiene unas propiedades que la hacen peculiar:

- Los fluidos supercríticos tienen un coeficiente de difusión mayor y una viscosidad menor que los líquidos, lo que permite mejorar la transferencia de materia.
- La ausencia de tensión superficial permite a los fluidos supercríticos la rápida penetración dentro de los poros de matrices heterogéneas, lo cual mejora la eficiencia de la extracción.
- La selectividad de la extracción puede manipularse variando las condiciones de temperatura y presión modificando la solubilidad de los distintos componentes en el fluido supercrítico.
- La densidad por encima del punto crítico depende de la presión y la temperatura, pero en cualquier caso está más cercana a la de los líquidos que a la de los gases. La densidad aumenta si lo hace la presión a temperatura constante o si disminuye la temperatura a presión constante.
- La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas muy favorables.
- Posibilidad de llevar a cabo procesos en condiciones moderadas (40-80 °C/120-350 bar). Ideal para compuestos naturales termolábiles.
- Posibilidad de acoplar procesos enzimáticos a un proceso de extracción supercrítica (147, 148).
- La recuperación in situ del catalizador.
- La extracción con fluidos supercríticos no deja residuos químicos.
- Extracción multiproducto versátil con un único disolvente y/o cosolvente.
- Bajos costes de energía y operación (145).
- Esteriliza el producto (145).

1.3.2. Fluidos supercríticos para la industria alimentaria

Un fluido debe poseer una serie de propiedades, además de las anteriormente mencionadas, para poder emplearse como disolvente en la industria y, especialmente, en la industria alimentaria. Éstas son:

- Alta capacidad disolvente además de selectiva.
- Nula o baja inflamabilidad.
- Fácil de obtener con elevada pureza.
- Bajo precio.
- Baja o nula toxicidad.
- No ser agresivo con el medio ambiente.
- Poseer condiciones críticas moderadas.
- Gaseoso en condiciones de presión y temperatura ambiente.
- Alta capacidad disolvente además de selectiva.

De entre los fluidos supercríticos más estudiados, normalmente, el dióxido de carbono es el disolvente empleado debido a que la mayoría de fluidos o bien son difíciles de usar y/o de obtener de forma pura (hexafluoruro de azufre y los hidrocarburos halogenados), o presentan problemas de inestabilidad química (dióxido de nitrógeno), o tienen escaso poder solvente a temperaturas moderadas (propeno y n-propano) o presentan problemas de inflamabilidad y explosividad en presencia de aire (eteno, etano, n-propano) (149). Además el dióxido de carbono es considerado como GRAS, puede ser reutilizado, no es corrosivo, trabaja en condiciones de extracción suaves debido a su bajo punto crítico, lo que evita la degradación de compuestos bioactivos, baja toxicidad (PEL 5000 ppm), no es caro (3,7 euros/kg), no es inflamable y su poder de disolución es fácilmente manipulable variando la presión y la temperatura de trabajo (150).

Sin embargo, el dióxido de carbono supercrítico puro (SCCO₂) no es adecuado para la extracción de compuestos polares, ya que éstos poseen una solubilidad limitada en SCCO₂, lo que limita la aplicación de esta tecnología. Para superar esta limitación, se suele añadir un cosolvente polar que aumenta la solubilidad de estos compuestos polares (151). De acuerdo con Moyler (152), sólo el agua y el etanol pueden considerarse como cosolventes “naturales” para productos alimenticios, porque la aplicación de hexano y otros disolventes orgánicos para aumentar la solubilidad del CO₂ elimina una de sus ventajas más importantes para la industria de alimentos: la ausencia de residuos de disolventes orgánicos tóxicos. En la actualidad, la Unión Europea también considera que el uso de isopropanol como cosolvente no deja residuos en el extracto (Directiva del Consejo 92/115/CEE, de 17 de diciembre, por la que se modifica por primera vez la Directiva 88/344/CEE y traspuesta al ordenamiento jurídico español por el Real Decreto 226/1994 de 11 de febrero).

El SCCO₂ se aplica en muchos campos diferentes, especialmente en tecnología de alimentos, agricultura, cromatografía de fluidos supercríticos y en la industria química y petroquímica. La utilización de la extracción con CO₂ supercrítico aplicada a la recuperación de ingredientes alimentarios es hoy día una práctica habitual. El SCCO₂ se emplea mayoritariamente en extracción y análisis (153). Ejemplos de aplicaciones alimentarias actuales a nivel industrial se muestran en la Tabla I-5. La extracción con fluidos supercríticos para la elaboración de nuevos alimentos ha experimentado un rápido crecimiento desde su primera aplicación industrial para la eliminación de cafeína del café. Éstas comprenden la extracción y purificación de grasas y aceites vegetales, la extracción de especias para obtener colorantes naturales, aromas y esencias, la eliminación de plaguicidas o de impurezas naturales, la obtención de nutraceuticos como vitaminas, antioxidantes de plantas o aceites esenciales, aceites de pescado o derivados desodorizados y purificados, etc.

Tabla I-5. Aplicaciones industriales del CO₂ supercrítico en el sector de la alimentación.

Aplicación	Productos	Principios Activos	Referencia
Extracción de aromas naturales	Frutas	Aromas y esencias	(154)
Obtención de aceites esenciales y oleorresinas de especias y plantas aromáticas	Aceites esenciales y oleorresinas		(155)
Extracción de colorantes naturales	Plantas coloreadas	B-carotenos, xantofilas, licopeno, cúrcuma	(156)
Extracción de aceites vegetales	Ricos en aceite	Soja, colza, oliva, girasol, cacao,...	(157)
Eliminación de grasas	Patatas fritas		(158)
Fraccionamiento de aceites y grasa	Aceites y grasas	Oleínas y estearinas	(159)
Eliminación de residuos de productos alimentarios	Productos contaminados	Pesticidas, contaminaciones microbiológicas	(160)
Desgrasado de cacao	Cacao	Manteca de cacao	(161)
Obtención de antioxidantes naturales	Fuentes naturales de polifenoles	Compuestos fenólicos de bajo peso molecular, flavonoides	(162)
Extracción y desterpenación de aceites esenciales	Frutas	Terpenos	(163)
Eliminación de nicotina	Tabaco	Nicotina	(164)
Reducción de alcohol en bebidas	Bebidas alcohólicas	Alcohol	(165)
Obtención de extractos de lúpulo	Lúpulo	Extracto	(166)
Descafeinización	Excitantes	Cafeína	(167)
Extracción de Vitamina E	Fuentes naturales		(168)
Esterilización	Legumbres y cereales		(145)
Conservación	Zumo de Aloe		(145)
Encapsulación de líquidos para ingeniería de productos sólidos			(169)

A nivel de investigación, las aplicaciones más recientes de la SFE en el área de ingredientes funcionales comprenden la obtención de extractos con actividad antioxidante y antimicrobiana a partir de microalgas (181-184), extracción de aceites esenciales de vegetales (170) y distintas hierbas aromáticas tales como antioxidantes de orégano (171), antimicrobianos de romero (172) o antidepresivos de hipérico (173), la extracción de carotenoides de zanahoria (174), licopeno de tomate (175), escualeno de aceite de oliva (176) o diferentes plantas (177) y la extracción de vitaminas liposolubles de queso (178). Mediante el uso de modificadores también se han llevado a cabo procesos de extracción de polifenoles de diversas frutas (179, 180).

A pesar de considerarse la extracción con SCCO₂ un proceso medioambientalmente “amigo”, los críticos creen que no lo es, ya que elimina a la atmósfera CO₂ causante de efecto invernadero y del calentamiento global del planeta. A pesar de ser cierta esta afirmación, es fácilmente rebatible ya que en primer lugar el CO₂ comprimido que se emplea no se produce específicamente para la extracción supercrítica, normalmente se produce como subproducto en la fabricación de amoníaco, en proporción 1 a 1. Por lo tanto no contribuye al aumento de la cantidad total en la atmósfera. Además, la práctica habitual en procesos industriales es la recirculación del CO₂ utilizado, y por tanto, la no liberación incontrolada de elevadas cantidades de CO₂ a la atmósfera. La situación ideal se presentaría si el CO₂ se capturase directamente de la atmósfera.

1.3.3. Extracción con fluidos supercríticos

1.3.3.1. Legislación

La extracción con fluidos supercríticos es un proceso de extracción industrial, donde uno o más componentes se separan de la mezcla introducida, pudiendo ser el producto deseado tanto el extracto como el residuo de extracción. Actualmente la legislación española en materia de *disolventes de extracción empleados en el ámbito alimentario* es competencia ejecutiva de la Comisión Europea (Libro blanco sobre Seguridad Alimentaria, COM (1999) 719, de 12 enero) quien decidió una aproximación de las legislaciones de los estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes en junio de 1988, por medio de la Directiva 88/344/CEE. Dicha directiva se encuentra transpuesta al ordenamiento jurídico español por medio del Real Decreto 472/1990, de 6 abril por el que se regulan los disolventes de extracción utilizados en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes (B.O.E. 12.04.1990). Tras la última modificación efectuada (RD 2667/1998), la lista de disolventes que pueden emplearse, respetando siempre las “buenas prácticas de fabricación” (GMP), tanto para extracción como para la redisolución de extractos, es la siguiente:

- a. Agua.
- b. Propano.
- c. Butano.
- d. Acetato de butilo.
- e. Acetato de etilo.
- f. Etanol.
- g. Anhídrido carbónico.
- h. Acetona .
- i. Protóxido de nitrógeno.

Además de los disolventes incluidos en dicha lista, se podrán emplear otros siempre que se utilicen según las indicaciones que aparecen en el anexo del RD 472/1990. Quedan excluidos del uso todos aquellos disolventes que no estén incluidos expresamente en el mismo.

Esta legislación define un disolvente de extracción como (art. 2.2 RD 472/1990) “un disolvente utilizado en el proceso de extracción durante el tratamiento de materias primas, de productos alimenticios, de componentes o de ingredientes de dichos productos, que se elimine y que pueda provocar la presencia, involuntaria, pero técnicamente inevitable, de residuos o de derivados en el producto alimenticio o en el ingrediente (...) Se considera que un disolvente de extracción se utiliza de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación si su empleo sólo produce la aparición de residuos o de derivados y en cantidades técnicamente inevitables y que no suponen riesgos para la salud humana” (anexo parte I).

Y es precisamente en este punto donde reside otra de las ventajas del CO₂: que es un gas a temperatura y presión ambiente, con lo que la eliminación del disolvente de extracción es inmediata y la presencia de residuos prácticamente nula. Esto no ocurre en las extracciones “clásicas”, en las que se emplean disolventes orgánicos. Muchos de estos compuestos han demostrado ser tóxicos y perjudiciales tanto para la salud como para el medio ambiente.

Afortunadamente, en la actualidad existe una tendencia dirigida hacia la eliminación de este tipo de disolventes. Dos ejemplos claros de dicha tendencia son: el Protocolo de Montreal (1989) relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono y el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes, que entró en vigor en mayo de 2004 y que fue ratificado por España (BOE 23 junio 2004, núm. 151, [pág. 22737]; Instrumento de Ratificación del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, hecho en Estocolmo el 22 de mayo de 2001). Además, la decisión 2006/507/CE, firma, en nombre de la Comunidad Europea, el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. La UE ya ha adoptado instrumentos referentes

a materias que rige el Convenio, incluidos el Reglamento (CE) nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a los contaminantes orgánicos persistentes.

Ambos tratados fueron propuestos por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y ratificados por una amplia mayoría de países entre ellos España y la Unión Europea. De hecho, el CO₂ no sólo está admitido en ambos tratados, sino que está reconocido por las normas del Codex Alimentarius como apto para su empleo en alimentos ecológicos (Guidelines for the production, processing, labelling and marketing of organically produced foods (GL 32 – 1999, Rev. 1 – 2001)).

1.3.3.2. Equipamiento básico para la extracción supercrítica

Los componentes que incluye un equipo de extracción supercrítica se pueden ver en el esquema de la Figura I-11. El CO₂ procedente de la botella **1** es impulsado por la bomba **2**, hasta la celda de extracción **4**, donde se encuentra la materia prima a extraer, que se suele encontrar dentro de un horno que controla la temperatura a alcanzar durante la extracción por encima del punto crítico **3**. Los componentes de la materia prima disueltos o arrastrados por el CO₂ precipitan en el separador **6** debido a la disminución del poder solvente del CO₂ al reducir la presión **5**. En caso de que sea necesaria la adición de modificadores **7**, éstos suelen mezclarse con la corriente de CO₂ mediante una bomba **8** y antes de entrar en el extractor.

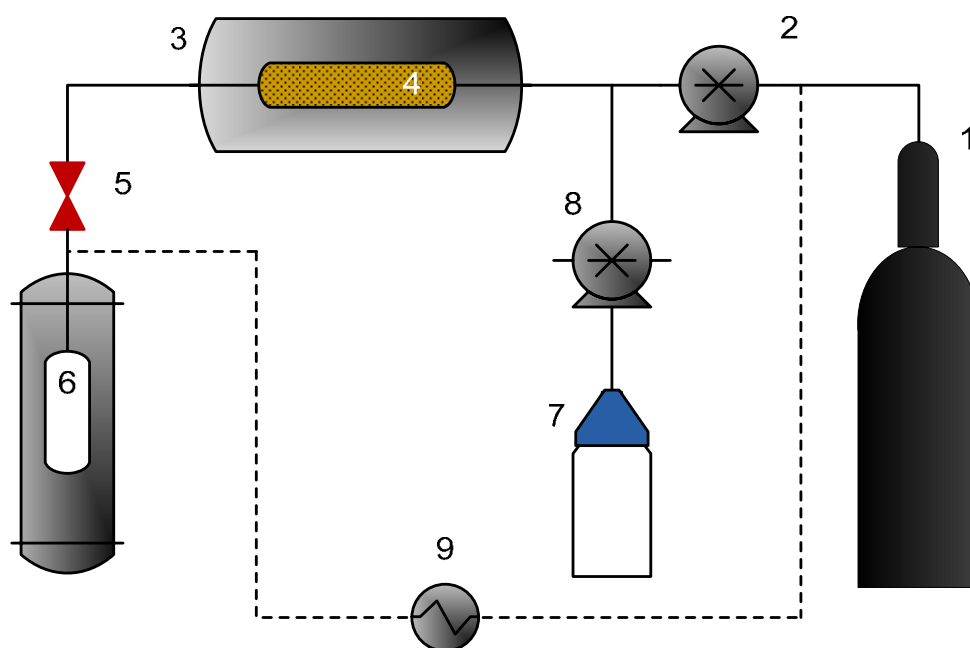


Fig. I-11.-Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos

Dado que los alimentos suelen ser mezclas altamente complejas, lo más habitual es que los extractos obtenidos también lo sean. Por ello es muy frecuente tener que realizar un fraccionamiento de extractos. El fraccionamiento en condiciones supercríticas consiste en una disminución progresiva del poder disolvente con la consiguiente precipitación en cascada de los compuestos extraídos en los separadores donde se produce esta disminución de densidad. Para poder realizar fraccionamiento supercrítico sería necesario añadir diferentes separadores al esquema del proceso de la Figura I-9. Además, si se quiere hacer una recirculación de CO₂, sería necesario licuar el CO₂ a la salida de los separadores mediante una etapa de enfriado con un intercambiador de calor **9**.

1.3.3.3. *Extracción de carbohidratos con fluidos supercríticos*

Como se ha comentado anteriormente, los carbohidratos disponibles comercialmente se purifican generalmente por técnicas cromatográficas y procesos de membrana (181, 182), aunque la mayoría de los procesos industriales hacen uso de las técnicas cromatográficas (183). Una de las principales dificultades en la purificación de mezclas de carbohidratos es el elevado coste de los procesos y la limitación en el uso de disolventes o reactivos de grado alimentario.

La tecnología de extracción con fluidos supercríticos, en gran medida, ha sido utilizada para sustancias apolares, aunque el empleo de modificadores permite la extracción selectiva de compuestos polares como los carbohidratos. Sin embargo, aun teniendo en cuenta el gran interés de la tecnología basada en el empleo de fluidos supercríticos, existen muy pocas referencias (184, 185) relacionadas con el fraccionamiento de carbohidratos con SCCO₂. Los trabajos descritos en la bibliografía se basan fundamentalmente en la medida de solubilidades y equilibrios de fases de carbohidratos en sistemas ternarios y cuaternarios (186-188) y ponen de manifiesto que el empleo de cosolventes polares aumenta considerablemente la solubilidad de los carbohidratos en medio supercrítico y permite la separación de mezclas complejas. Ninguno de ellos se ha dirigido hacia la purificación y/o fraccionamiento selectivo de algunos carbohidratos de interés en mezclas sólidas con otros carbohidratos de naturaleza similar.

Sólo existe un antecedente bibliográfico que aborda la separación de mezclas de carbohidratos (glucosa y fructosa) mediante CO₂ supercrítico y consiste en la utilización de adsorbentes como carbón activo. Bracey *et al*, (186) demostraron que las afinidades relativas de la glucosa y la fructosa por el carbón activo cuando se tratan con CO₂ supercrítico, que contiene pequeñas cantidades de etanol, son suficientemente distintas como para permitir la separación de ambos carbohidratos. A 65 °C y 151.6 bar es posible desorber el 99% de la glucosa mientras que solamente el 2% de la fructosa es desorbida.

Estos estudios se emplearon como punto de partida para abordar el fraccionamiento de carbohidratos objeto de estudio en la presente memoria.

Al tratar el presente trabajo de la obtención de ingredientes alimentarios, sólo se deberían emplear como modificadores compuestos declarados GRAS (Generally Recognized As Safe³) por las autoridades competentes en materia alimentaria como son la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), la FAO (Food and Agriculture Organization, Naciones Unidas) o la EFSA (European Food Safety Authority, Unión Europea), es decir, etanol y agua. Éstos, junto con el CO₂, son precisamente los seleccionados para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

1.4. Estudio del fraccionamiento de carbohidratos

Los primeros pasos de esta memoria se encaminaron a la obtención de valores experimentales que permitieran extraer información para diseñar el proceso de fraccionamiento de carbohidratos prebióticos en medio supercrítico. Dado que la bibliografía en el tema es muy escasa, se realizaron medidas de solubilidad de los diferentes carbohidratos implicados en distintos alcoholes que podrían ser empleados como cosolventes en la extracción supercrítica. Las medidas de solubilidad se hicieron a presión ambiente y en condiciones supercríticas.

Por un lado se podrían obtener valores experimentales útiles para el posterior desarrollo de esta tesis y con estos nuevos valores y con otros ya disponibles en la bibliografía se podría llevar a cabo un modelado termodinámico. De esta manera se obtendría información adicional de cómo se comporta el sistema a diferentes condiciones de trabajo.

Para el estudio y el desarrollo industrial de estos procesos es necesario disponer tanto de datos de solubilidad como de modelos termodinámicos apropiados.

1.4.1. Solubilidades a presión ambiente

Existen datos de solubilidad para diferentes carbohidratos desde finales del siglo XIX (187). Las solubilidades de los carbohidratos más comunes (glucosa, fructosa, lactosa, xilosa, manosa y sacarosa) en mezclas metanol/agua y etanol/agua están disponibles en la bibliografía (188-193), así como las correspondientes a xilosa y manosa en etanol-agua (194) y glucosa en etanol-agua (195). Por lo que respecta a los carbohidratos prebióticos que se describen en esta memoria, existen algunos estudios preliminares que muestran que la solubilidad de la lactulosa es mayor que la de lactosa en alcoholes a temperatura ambiente y con contenidos de agua superiores al 5 % (39). Sin embargo, no hay estudios para la mezcla binaria tagatosa-galactosa.

³ <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html> (Numerical Listing of GRAS Notices).

1.4.1.1. *Solubilidades en sistemas no acuosos y mezcla de disolventes*

Aunque existen bastantes datos disponibles en la bibliografía en relación a la solubilidad de carbohidratos en disolventes acuosos (fructosa y glucosa en agua (196) y xilosa y manosa en agua (197), por ejemplo), también existe un cierto desacuerdo en algunos de los datos, siendo el rango de temperaturas cubierto muy pequeño. Para las mezclas de varios disolventes, los valores disponibles eran escasos hasta hace diez años, a pesar de la importancia de estos datos a la hora del modelado o del diseño y escalado de procesos de separación. A principio de la década de los 90, se aplicó un programa experimental para cubrir la falta de datos. Actualmente hay disponibles valores para D-glucosa en agua/metanol, agua/etanol y metanol/etanol a 35, 40 y 60 °C (195), D-fructosa en agua/metanol, agua/etanol y metanol/etanol a 25, 40 y 60 °C (189, 198), D-manosa y D-xilosa en etano/agua a 25 °C (194), sacarosa en agua/metanol, agua/etanol y metanol/etanol a 25, 40 y 60 °C (192) y lactosa en agua/etanol a 25, 40 y 60 °C (190).

Un programa de la IUPAC está actualmente en curso para recopilar y evaluar valores de solubilidades para carbohidratos (199). Sin embargo, sigue sin existir información de solubilidades para sistemas con múltiples carbohidratos en mezclas de disolventes (200).

Las disoluciones de carbohidratos son importantes en muy diversas áreas, como por ejemplo para la industria alimentaria. A menudo están involucradas en procesos de cristalización. El aumento del interés de los sistemas que contienen estas soluciones de carbohidratos ha hecho evidente la necesidad de datos experimentales y de adecuados modelos termodinámicos capaces de representar estos datos experimentales.

A pesar de la importancia de estos sistemas, demostrado por el aumento de publicaciones en el tema (190-192, 194, 195, 198, 201), todavía existe una falta de información en los equilibrios sólido-sólido de mezclas multicomponentes de disolventes acuosos y no acuosos que contienen carbohidratos.

1.4.1.2. *Modelado termodinámico*

El modelado termodinámico de los sistemas que contienen carbohidratos es difícil, ya que los carbohidratos en solución presentan un comportamiento complejo. Presentan anillos de cinco o seis átomos de carbono, y a la vez, tienen un carbono quiral que permite la existencia de anómeros en el equilibrio.

La estimación de propiedades de las soluciones de carbohidratos ha recibido mucha atención y numerosos planteamientos. Se pueden dividir en dos tipos: modelos estadísticos y termodinámicos. Los primeros, llamados estadísticos por Leschke (202), fueron usados por Kononenko y Herstein (203) y por Vasatko y Smelik (204) para representar la solubilidad de carbohidratos (D-fructosa y sacarosa) con la temperatura empleando ecuaciones polinomiales. Más recientemente, los investigadores se han familiarizado más

con los modelos termodinámicos para el estudio de las diferentes propiedades de las soluciones de carbohidratos.

Los datos sobre equilibrio de fases para soluciones de carbohidratos están limitados básicamente a soluciones acuosas. Sin embargo, para sistemas multicomponentes, esos datos son mucho más escasos. Por otro lado hay una necesidad creciente de modelado termodinámico de esos sistemas, necesario para el diseño y la simulación de biorreactores, desarrollo de procesos de separación como la extracción líquida, la vaporización, la cristalización, ... En la bibliografía ya hay disponibles bastantes modelos termodinámicos en soluciones acuosas (205-211), mientras que el número de modelos termodinámicos presentados en soluciones no acuosas es muy inferior (207, 209-211).

1.4.1.2.1. Elección del modelo termodinámico

La elección de un modelo termodinámico se basa en el grado de comportamiento ideal o no y en las condiciones de trabajo. Los diferentes planteamientos para representar las propiedades físicas de los componentes se pueden ver en la Figura I-12:

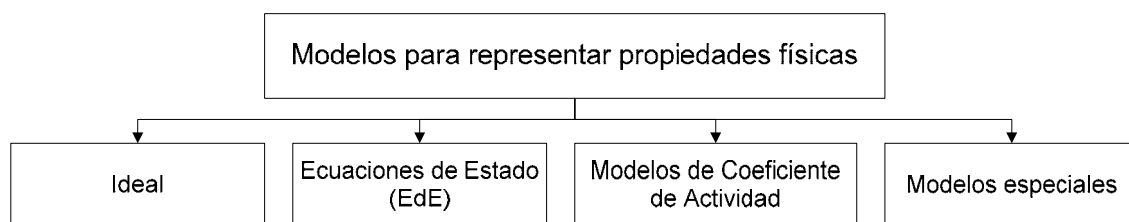


Fig. I-12.-Modelos de representaciones de las propiedades físicas.

¿Qué significa para nosotros un comportamiento ideal?. En un equilibrio de fases, su comportamiento es ideal cuando la fase vapor cumple la Ley de los Gases Ideales y la fase líquida cumple la Ley de Raoult. El grado de idealidad o no estará directamente afectado por las interacciones moleculares: polaridad, tamaño y forma de las moléculas.

En la actualidad, para aquellos equilibrios que no son ideales, el cálculo de las propiedades termodinámicas y de los equilibrios de fase se lleva a cabo empleando las ecuaciones de estado o los modelos basados en el coeficiente de actividad. Dentro de las ecuaciones de estado destacan las ecuaciones viriales, las basadas en modelos moleculares y las ecuaciones de van der Waals (vdW), que pueden ser cúbico-empíricas o no cúbicas (se entiende por ecuaciones de vdW aquellas cuyo factor de compresibilidad es la suma de las contribuciones atractivas más las repulsivas: $Z = Z^{rep} + Z^{atr}$). Las ecuaciones de estado son polinomios con parámetros que pueden resolverse para alguna variable termodinámica específica.

Por otra parte, los modelos basados en el coeficiente de actividad se dividen en modelos estadísticos de ajuste, como las ecuaciones de Margules y van Laar o la expansión

de Redlich/Kister, y en modelos de composición local, como la ecuación de Wilson, NRTL (NonRandom Two-Liquid), UNIQUAC (Universal Quasi-Chemical) y UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient). Estos métodos se basan en la energía de Gibbs en exceso y su relación con el coeficiente de actividad de las sustancias presentes en fase líquida. Las ventajas de cada uno y los modelos más empleados se muestran en la Tabla I-6.

También se basan en el criterio de isofugacidad, que para el equilibrio de fases requiere que para un sistema de múltiples fases, a la misma T y P , se encuentre en equilibrio, la fugacidad de cada componente debe ser la misma en todas las fases. El criterio de isofugacidad o equifugacidad, es de gran utilidad práctica para resolver problemas de equilibrio de fases, puesto que la fugacidad puede calcularse a través de datos PVT. La fugacidad, término introducido por Gilbert N. Lewis (212) es una medida del potencial químico en la forma de “presión ajustada”. Refleja la tendencia de una sustancia a preferir una fase (líquido, sólido o gas) a otras, y puede definirse literalmente como “la tendencia a huir o escapar”. Para una presión y temperatura dada, una sustancia homogénea tendrá una fugacidad diferente para cada fase. La fase con la fugacidad más baja será la más favorable y tendrá la menor energía libre de Gibbs.

Los modelos de coeficiente de actividad se emplearon en esta memoria para el ajuste termodinámico de solubilidades de carbohidratos a presión ambiente, mientras que las ecuaciones cúbicas de estado se emplearon para el ajuste termodinámico de solubilidades de carbohidratos en la región supercrítica. A continuación se discuten algunos aspectos relevantes de los modelos basados en los coeficientes de actividad y de los modelos termodinámicos basados en ecuaciones de estado, aunque se presenta una información más detallada en los capítulos correspondientes.

Tabla I-6. Modelos termodinámicos.

Modelos de EdE	Modelos de Coeficiente de Actividad
Capacidad limitada para representar líquidos no ideales	Pueden representar líquidos no ideales
Se necesitan pocos parámetros binarios	Se necesitan numerosos parámetros binarios
Los parámetros se pueden extrapolar razonablemente con la temperatura	Los parámetros binarios son muy dependientes de la temperatura
Consistentes en la región crítica	Inconsistentes en la región crítica
Más empleados: SRK (Soave-Redlich-Kwong) PR (Peng-Robinson)	Más empleados: Wilson NRTL (Non Random Two Liquids) UNIQUAC (UNiversal QUAsi Chemical) UNIFAC (UNiversal Functional Activity Coefficient)

1.4.1.2.2. *Modelos de coeficientes de actividad*

Sólo se utilizan a presiones bajas y moderadas. No pueden aplicarse al equilibrio entre fases con fluidos supercríticos debido a que por su naturaleza no pueden representar en forma continua las transformaciones en la región crítica. Se basan en el cálculo de los llamados coeficientes de actividad.

El coeficiente de actividad de los componentes en un sistema es un factor de corrección que tiene en cuenta las desviaciones de los sistemas reales respecto a la situación ideal, el cual se puede determinar de manera experimental o estimar a partir de modelos (similar al coeficiente de fugacidad para los gases).

1.4.1.2.3. *Modelos de coeficientes de actividad más empleados*

El modelo de soluciones ideales es útil como primera aproximación y como referencia; sin embargo, las desviaciones de la idealidad son, frecuentemente, de gran magnitud y no permiten utilizar el modelo ideal con fines de diseño y control. Estas desviaciones se expresan a través de funciones en exceso que dependen de las concentraciones y de la temperatura. Estas funciones se expresan comúnmente como expansiones algebraicas de las fracciones molares con coeficientes arbitrarios que se obtienen mediante el ajuste de datos experimentales. Tales expansiones poseen tantos términos y parámetros como sea necesario para conseguir representaciones apropiadas de la realidad. En este grupo caben la expansión de Redlich/Kister y los modelos de Margules y van Laar, los cuales se aplican con éxito en mezclas binarias aunque no pueden ser extendidos a sistemas multicomponentes.

Por su parte, Wilson mostró que la energía de Gibbs en exceso g^E , podía ser convenientemente expresada mediante una función algebraica de la composición local y desarrolló la ecuación que lleva su nombre, empleando fracciones volumétricas locales. Tiempo después, Orye determinó que la ecuación de Wilson es útil para representar los datos de equilibrio de una gran variedad de mezclas líquidas. Otros modelos que emplean las composiciones locales son NRTL, UNIQUAC de Abrams y Prausnitz, la ecuación de Heil que modifica la ecuación de Wilson para representar el equilibrio en soluciones poliméricas y UNIFAC, el cual calcula los coeficientes de actividad a partir de las contribuciones de los grupos funcionales que hacen parte de las moléculas en solución.

Por su naturaleza predictiva, la mayoría de modelos siguen la metodología de contribución de grupos; entre ellos el modelo UNIFAC constituye actualmente el método estandarizado más conveniente para evaluar los coeficientes de actividad en mezclas líquidas y, a partir de su estimación, permite predecir el Equilibrio Líquido+Vapor, para sistemas de comportamiento no ideal. Desarrollado por Abrams y Prausnitz en 1975 (213), tiene en cuenta las interacciones intermoleculares y la forma y tamaño de la molécula de

cada componente del sistema y es especialmente adecuado para evaluar el comportamiento de soluciones de compuestos orgánicos. Se basa en el concepto de que en una mezcla líquida las propiedades de la solución están determinadas por las propiedades de las especies presentes no consideradas como estructuras moleculares integradas, sino como la relación e interacción de grupos funcionales determinados que estructuran cada molécula (214).

Por otra parte, el coeficiente de actividad se evalúa en términos de la energía libre en exceso, es decir, la energía “extra” de la solución que la hace no ideal. Y a su vez, el coeficiente de actividad es un reflejo de esa no idealidad.

Existen disponibles en la bibliografía varios métodos modificados basados en el modelo UNIFAC.

También se ha aplicado ampliamente a carbohidratos. Los carbohidratos forman enlaces de puente de hidrógeno fuertes con otros carbohidratos y con agua u otros disolventes como alcoholes. Normalmente, las modificaciones añadidas al modelo UNIFAC incluyen diferentes términos combinatorios y residuales, pero en la versión presentada por Ferreira *et al.* (207), el modelo A-UNIFAC tiene en consideración los efectos de asociación entre carbohidratos, agua y alcoholes introduciendo un término específico en la ecuación original basada en la teoría de asociación de Wertheim (215). Este ha sido, por tanto, el seleccionado en la presente memoria para representar los valores obtenidos y para evaluar su capacidad para predecir las solubilidades en mezclas ternarias carbohidrato-alcohol-alcohol y carbohidrato-alcohol-agua. Como se ha comentado, los detalles relativos a este modelo termodinámico se explican en el capítulo correspondiente.

1.4.1.2.4. Modelos termodinámicos basados en ecuaciones de estado (EdE)

Como se ha mencionado en el apartado anterior, existen una gran variedad de modelos que vinculan las propiedades PVT de un sistema multicomponente y, por lo tanto, pueden representar el equilibrio entre fases. Estos modelos se han desarrollado dependiendo de la naturaleza química de las sustancias que intervienen y de las interacciones que presentan entre sí. La medición de datos experimentales de equilibrio es de suma importancia para determinar los parámetros de dichos modelos y verificar su capacidad de correlación y predicción.

Para el cálculo del equilibrio líquido+líquido (ELL) así como para el equilibrio líquido+vapor (ELV) existen dos tipos de modelos termodinámicos:

- Modelos de coeficientes de actividad (empleados para el modelado termodinámico a presión ambiente)

- Ecuaciones de Estado (EdE; adecuados para el modelado termodinámico en la región supercrítica)

Como se ha visto en el apartado anterior para el modelado termodinámico, la inconsistencia que presentan los modelos basados en coeficientes de actividad en la región supercrítica no está presente en las EdE, por lo tanto este tipo de ecuaciones es el que ha sido elegido para el modelado termodinámico de las solubilidades en medio supercrítico.

La ecuación de estado más simple es la de los gases ideales ($PV = RT$). Sin embargo, esta ecuación no es suficiente para describir el equilibrio de fases, puesto que para una condición dada de P y T se obtiene, a partir de esta ecuación, un valor solamente para V (correspondiente al volumen molar de una fase gaseosa). La introducción de consideraciones físicas en la ecuación de los gases perfectos, para considerar el volumen finito de las moléculas y las fuerzas de interacción entre las mismas, dio lugar a las llamadas EdE-cúbicas, ampliamente utilizadas en análisis de datos experimentales y aplicaciones de ingeniería, debido a su simplicidad matemática.

La EdE de Van der Waals (1873) fue la primera ecuación en describir la separación de fases y el punto crítico. La mayoría de las EdE-cúbicas son variaciones de la ecuación de Van der Waals (VdW):

$$P = \underbrace{\frac{RT}{V-b}}_{\text{término repulsivo}} - \underbrace{\frac{a}{V^2}}_{\text{término atractivo}} \quad (\text{Ecuación I-1})$$

Los valores de a y b cuantifican, respectivamente, las fuerzas de interacción entre moléculas y el volumen de las mismas, y son función de los parámetros críticos: T_c y P_c .

Existe una familia de EdE similares a la ecuación de VdW, que han modificado la ecuación original a fin de mejorar sus predicciones de propiedades volumétricas y termodinámicas, así como su aproximación al equilibrio líquido-vapor. Todas pueden escribirse como la suma de un término atractivo y uno repulsivo. Básicamente, todas mantienen el término repulsivo original de VdW, variando la contribución atractiva y la forma de calcular los parámetros a y b . Dos de las ecuaciones más utilizadas derivadas de la ecuación de VdW son las ecuaciones cúbicas de estado de Redlich-Kwong (RK; (216)) y de Peng-Robinson (PR; (217)). Las ecuaciones SRK y PR son las ecuaciones de estado cúbicas más empleadas en áreas de investigación, simulación y optimización en las que se requiera el cálculo de propiedades termodinámicas o el equilibrio líquido-vapor, especialmente de sustancias no polares; aunque han sido utilizadas como simples estimaciones de propiedades volumétricas y presiones de vapor hasta herramientas para la descripción de complejos sistemas multicomponentes.

En 1972, Soave (218) introdujo en el cálculo del parámetro energético a una función, dependiente de la temperatura reducida ($T_r = T/T_c$) y del factor acéntrico ω (tiene en cuenta las características de la estructura molecular), para mejorar el ajuste de presiones de vapor de compuestos no polares. Posteriormente, Mathias y Copeman en 1983 (219), modificaron dicha funcionalidad reemplazando el factor acéntrico por tres nuevos parámetros característicos de cada compuesto, logrando una apropiada representación de las presiones de vapor de compuestos tanto no polares como polares.

En cuanto al término repulsivo, cabe mencionar que es significativamente importante cuando se trata de mezclas de componentes de tamaños muy diferentes, como es normalmente el caso de mezclas de productos alimentarios con SCCO_2 .

1.4.2. Solubilidades en medio supercrítico

El conocimiento de las solubilidades de diferentes compuestos en fluidos supercríticos es de gran importancia para un gran abanico de aplicaciones: producción de sistemas controlados de liberación de medicamentos, pulverización, prevención y remediación, métodos para recubrimiento y pulverización de pinturas, procesos de cristalización y precipitación, bioseparaciones y procesado de alimentos.

Los procesos que emplean fluidos supercríticos aprovechan las significativas variaciones de solubilidad con la presión cuando el disolvente es un fluido supercrítico. Esto permite llevar a cabo procesos que en otras condiciones no se podrían desarrollar. Para un completo conocimiento de los beneficios de estos procesos, primero se deben entender los comportamientos de las fases en estos sistemas.

Hay una gran diversidad de métodos para medir las solubilidades supercríticas, que pueden ser correlacionadas y predichas usando métodos termodinámicos.

1.4.2.1. Comportamiento de fase de los fluidos supercríticos y sus mezclas

Para entender el fenómeno de las solubilidades supercríticas, primero es necesario entender las características únicas de los fluidos supercríticos. El típico PV diagrama de fases para una sustancia pura se muestra en la Figura I-13:

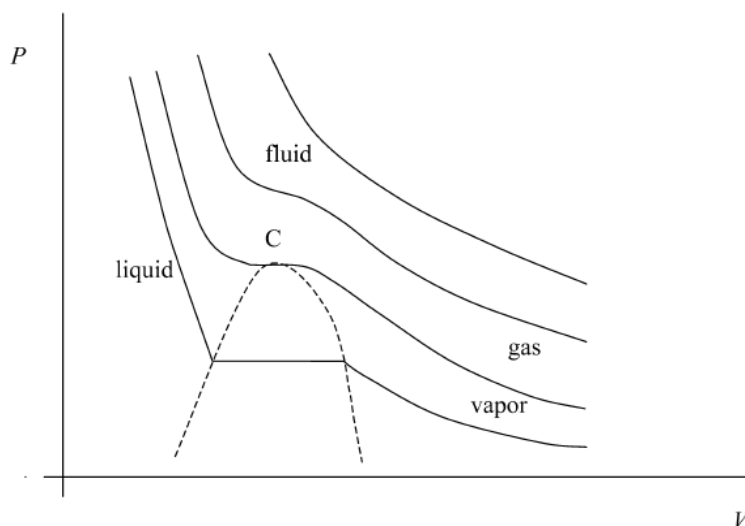


Fig. I-13.-Diagrama de fases PV para una sustancia pura.

Como se ha mencionado previamente, sólo hay una posible combinación de temperatura y presión que permite a las tres fases coexistir, ese punto es el punto triple. Es también el lugar donde las curvas de los tres equilibrios de fases (sublimación, fusión, evaporación) coinciden. La curva de vaporización empieza en el punto triple y acaba en el punto crítico. A lo largo de la curva, tanto la temperatura como la presión aumentan continuamente, pero son iguales para las dos fases en equilibrio. Otras propiedades termodinámicas que no se muestran en el diagrama, como el volumen, la entalpía, la entropía o la energía interna, también varían a lo largo de la curva, pero generalmente no son iguales para las dos fases en equilibrio. Sin embargo, a medida que se acerca al punto crítico, todas las propiedades termodinámicas de las dos fases se van igualando. En el punto crítico, todas las propiedades son iguales y las dos fases se convierten en una sola. Eso se demuestra con el diagrama presión-volumen (Fig. I-13).

Las curvas en la Figura I-13 representan isoterma. Las isoterma por encima de la temperatura crítica son continuas y monótonas con valores negativos de $(\delta P / \delta V)_T$. A temperaturas inferiores a la del punto crítico, la isoterma de equilibrio es diferente. La pendiente es discontinua en el límite de las dos fases. La longitud de la sección horizontal de la isoterma subcrítica refleja la diferencia entre los volúmenes molares de la fase líquida y vapor en equilibrio. Cuando la temperatura aumenta y se acerca a la temperatura crítica, las propiedades de las dos fases en equilibrio se acercan hasta ser idénticas la una a la otra. La

isoterma a la temperatura crítica se caracteriza por tener un punto de inflexión en el punto crítico. Por consiguiente, a la presión crítica, la isoterma de la compresibilidad es infinita.

La región correspondiente a temperaturas por encima de la temperatura crítica y presiones por encima de la presión crítica, es la llamada región supercrítica. Las propiedades de un fluido supercrítico han sido enumeradas previamente.

1.4.2.2. *Determinación experimental de solubilidades supercríticas*

La determinación experimental de solubilidades en fluidos supercríticos ha recibido mucha atención (220, 221). Las técnicas experimentales se pueden clasificar en tres categorías (ver Figura I-14). En todas ellas hay que tener muy en cuenta los diferentes fenómenos que aparecen en la región supercrítica.

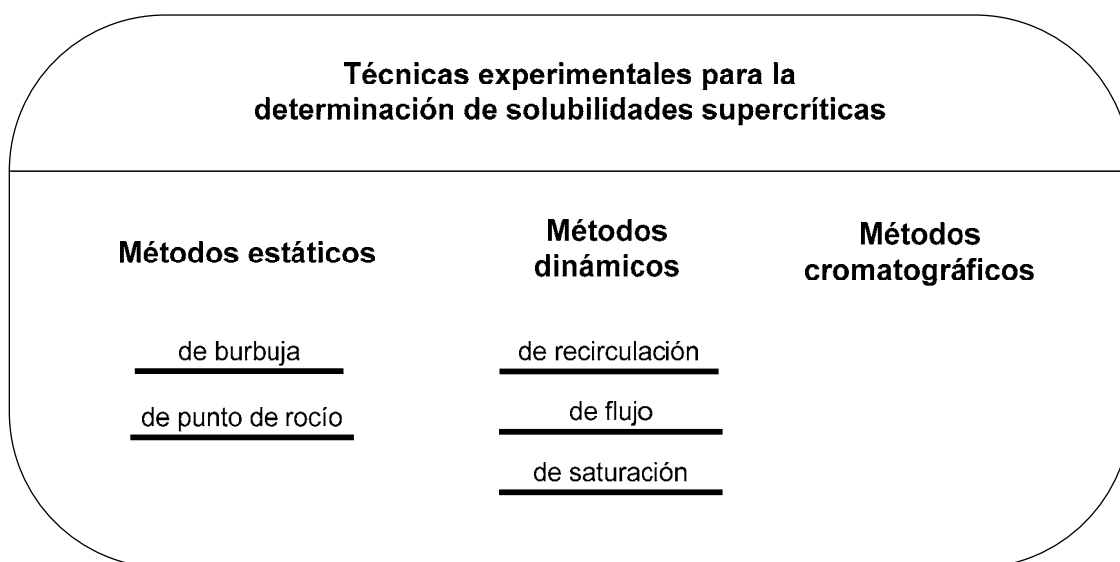


Fig. I-14.-Técnicas experimentales para determinar solubilidades supercríticas.

Los métodos estáticos consisten en una celda cerrada en cuyo interior están situados los componentes. No hay grandes movimientos en ninguna de las fases, aunque a menudo en el interior hay un agitador que se puede encender y apagar para conseguir el equilibrio, especialmente para solutos líquidos. Las celdas pueden ser de volumen variable y tener una “ventana” que permite controlar el proceso en todo momento. Las celdas suelen estar colocadas dentro de un baño para controlar la temperatura y tener un sensor para controlar la presión. La determinación de la composición de las fases se puede hacer por métodos analíticos o sintéticos.

Los métodos de recirculación son muy similares a los estáticos, sin embargo, estos métodos añaden bucles (loops) externos de recirculación que ayudan a acelerar el proceso de equilibrio. Algunos incluyen celdas con “ventanas” como en los métodos estáticos, otros recirculan las dos fases mientras que otros sólo recirculan una de ellas. Los bucles externos

facilitan el muestreo o el análisis de las fases, pero esta complejidad adicional suele conllevar problemas experimentales como pérdidas de presión en el bucle de recirculación, que puede acarrear la precipitación del soluto en la fase fluida.

Los métodos de flujo se caracterizan por un flujo continuo de todos sus componentes dentro y fuera del sistema. La formación y separación de las fases ocurre dentro de la celda. Ambas fases se muestrean y analizan para determinar las composiciones del equilibrio. La principal desventaja de estos métodos es que emplean mucha muestra y no hay una certeza absoluta del valor exacto de la presión durante el desarrollo del experimento.

En los métodos de saturación, una cantidad del soluto se coloca en la celda. A continuación, un determinado flujo de disolvente atraviesa la celda. Estando seguros de un tiempo de contacto suficiente, el flujo que sale se puede asumir que está saturado con el soluto. El soluto que sale con el disolvente es recogido en un recipiente. Comparando la cantidad inicial con la recogida y teniendo el valor del flujo del disolvente, se puede calcular la solubilidad del soluto en el disolvente para esas condiciones. La mayor dificultad es la certeza de que el flujo que sale está realmente saturado. Este método ha sido el empleado para la medida de solubilidades supercríticas llevadas a cabo en esta memoria y se explica de una manera más detallada en el capítulo 3.

Los métodos cromatográficos emplean un fluido supercrítico como fase móvil. El soluto es inyectado antes de la columna. El método relaciona el tiempo de retención y la solubilidad en el fluido. Este método no es muy empleado en la práctica.

En resumen, los métodos de saturación son los más simples y más empleados para la medida de solubilidades de solutos sólidos. Para líquidos, los métodos estáticos predominan. Cualquier método que implique muestreo requiere un cuidado adicional para evitar perturbar el equilibrio en la celda, y en el manejo de la muestra para evitar precipitación. Los métodos sintéticos para determinar la composición requieren métodos muy precisos para cargar la celda y para controlarla.

Capítulo II: Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Muestras

2.1.1.1. Duphalac®

Duphalac® (Duphar Nezel Solvay) es un producto farmacéutico consistente en una solución acuosa de carbohidratos compuesta por un 74 % de lactulosa, un 24 % de aldosas (12.2 % de galactosa, 6.6 % de lactosa y 5.2 % de epilactosa) y sólo un 2 % de otras cetosas (principalmente tagatosa) fue adquirido en farmacia. La composición se extrajo de la etiqueta y se comprobó por cromatografía de gases.

2.1.1.2. Vivinal GOS®

La mezcla comercial de GOS de la marca Vivinal GOS® fue suministrada por Borculo Domo. Vivinal GOS® es un jarabe de color claro con actividad prebiótica a bajas dosis, gran estabilidad térmica, alta solubilidad y bajo contenido calórico. Contiene además de GOS, lactosa, glucosa y pequeñas cantidades de galactosa. Se emplea en un amplio rango de formulaciones: productos lácteos, alimentación infantil, bebidas, alimentación para enfermos, panadería, ...

2.1.1.3. Lactozym 3000 L HP G

El enzima comercial Lactozym 3000 L HP G, preparación soluble de β -galactosidasas a partir de *Kluyveromices lactis* fue suministrado por Novozymes Corporation. Hidroliza la lactosa dando lugar a glucosa y galactosa (sabor más dulce). También se forman oligosacáridos (galactobiosa y galactotriosa) durante las primeras etapas de la reacción y con elevadas concentraciones de lactosa. Se emplea comúnmente en la producción de productos lácteos y helados y para la preparación de leches con bajos contenidos en lactosa para personas intolerantes a la lactosa. Su uso evita la adición de grandes cantidades de saborizantes y en la producción de leche condensada reduce el riesgo de espesamiento al evitar la coagulación de la caseína y evita la cristalización de la lactosa.

2.1.2. Reactivos

La lactulosa (>98 %, para HPLC), tagatosa (D-(-)-tagatose), galactosa (D-(+)-galactose), fructosa (D-(-)-Fructose 99+%), glucosa (D-(+)-Glucose), rafinosa, estaquirosa

fenil- β -glucósido, metanol y cinco de los agentes derivatizantes (ácido trifluoroacético, 99+% grado espectrofotométrico, el hexametildisilazano y el hidrocloreuro de hidroxilamina, fueron de grado analítico ACS. El *N*-trimetil-silil-imidazol y el clorotrimetilsilano) fueron suministrados por Sigma. La piridina y el ácido bórico fueron proporcionados por Merck. La lactosa (monohidrato pura), el tamiz molecular (3 Å, en forma de perlas de 2-3 mm), el 1-Propanol y el 2-Propanol se adquirieron a Scharlau Chemie S.A. La arena de mar, la lana de vidrio lavada químicamente, el ácido sulfúrico y el 1-butanol fueron suministrados por Panreac Química S.A. El etanol fue adquirido a Prolabo y el hexano y el aluminato sódico a Carlo Erba Reagenti. El CO₂ licuado empleado en el sistema extractor de fluidos supercríticos fue suministrado por Praxair Inc. Finalmente, el agua ultrapura Milli-Q (18.2 MΩcm con 1–5 ppb TOC (carbono orgánico total) y < 0.001 EU/mL niveles de materiales pirolizables) que se utilizó en todos los experimentos, fue obtenida en el laboratorio usando un sistema de purificación Milli-Q Synthesis A10 de Millipore.

2.2. Métodos

2.2.1. *Obtención de GOS isomerizados*

2.2.1.1. *Síntesis enzimática de GOS a partir de Lactozym 3000 L HP G*

La síntesis de GOS fue llevada a cabo en las condiciones óptimas según Martínez-Villaluenga *et al.* (222). Para la formación mayoritaria de disacáridos: se prepararon soluciones de lactosa (250 g/L) en una solución tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7.5 que contenía 1 mM de cloruro magnésico. A esta solución se añadió el enzima (3 unidades/mL) y se incubó durante 2 horas a 40 °C. Una vez transcurridas las 2 horas, la mezcla se puso en un baño de agua hirviendo para inactivar el enzima.

Para la formación mayoritaria de monosacáridos: se prepararon soluciones de lactosa (250 g/L) en una solución tampón fosfato potásico 50 mM a pH 6.5 que contenía 1 mM de cloruro magnésico. A esta solución se añadió el enzima (3 unidades/mL) e incubado durante 5 horas a 50 °C. Una vez transcurridas las 5 horas, la mezcla se puso en agua hirviendo para inactivar el enzima.

Los experimentos se hicieron por cuadruplicado a pequeña escala (1 g) para ver que la reacción era reproducible y que no le afectaba el escalado y posteriormente se llevó a cabo la reacción a una escala mayor (60 g).

2.2.1.2. *Isomerización de GOS*

Los productos obtenidos en el apartado anterior se liofilizaron, como paso previo a las reacciones de isomerización con aluminato sódico o ácido bórico.

2.2.1.2.1. *Isomerización con aluminatos*

Los ensayos de isomerización se llevaron a cabo siguiendo los métodos de Zokaee (38) y Cardelle-Cobas (223). De esta manera, los GOS producidos a partir de la transgalactosilación enzimática de la lactosa en agua desionizada (250 g/L) fueron mezclados con aluminato sódico (Na_2AlO_2) en diferentes relaciones molares aluminato sódico/carbohidrato de 1:1 y 2:1 (calculado sobre la base del contenido inicial de lactosa antes de la síntesis de GOS). La mezcla se colocó en un baño con agitación a 40 °C durante un tiempo determinado. Se tomaron muestras de 500 µL de la reacción de isomerización a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas. La reacción de isomerización se paraba colocando la muestra en hielo.

Una vez acabada la reacción se realizaron dos variantes, la primera era neutralizar la reacción con ácido sulfúrico al 25 % hasta que alcanzaba pH 4 y después añadir CaCO_3 para elevar el pH hasta 6.5 para precipitar los aluminatos. La muestra se filtraba y posteriormente se liofilizaba. La segunda variante fue liofilizar la muestra sin neutralizar la reacción de isomerización.

En primer lugar se hicieron cuatro experimentos a pequeña escala (1 g) para comprobar que la reacción era reproducible y posteriormente se llevó a cabo la reacción a una escala mayor (8 g).

2.2.1.2.2. *Isomerización con boratos*

Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el método de Zokae (38) con varias modificaciones. De esta manera, los GOS producidos a partir de la transgalactosilación enzimática de la lactosa en agua desionizada (250 g/L) fueron mezclados con ácido bórico (H_3BO_3) en diferentes relaciones molares ácido bórico (H_3BO_3)/carbohidrato de 1:1 y 2:1 (calculado sobre la base del contenido inicial de lactosa antes de la síntesis de GOS). La reacción se llevó a cabo en un baño termostatzado y se le añadió gota a gota una solución de 1 g NaOH/mL de agua hasta alcanzar un pH de 11 (a pH 9 ya se habían disuelto los reactivos). Una vez alcanzado el pH de 11 se calentó la solución hasta 70 °C y se tomó muestra a los 60, 90, 120, 150 y 180 minutos.

Una vez acabada la reacción se realizaron las dos mismas variantes que para las isomerizaciones con aluminatos sódico, la primera era neutralizar la reacción con ácido sulfúrico al 25 % hasta que alcanzaba pH 4 y después añadir CaCO_3 para elevar el pH hasta 6.5 y para precipitar los boratos. La muestra se filtraba y posteriormente se liofilizaba. La segunda variante fue liofilizar la muestra sin neutralizar la reacción de isomerización.

También como en las isomerizaciones con aluminato sódico, se llevaron a cabo cuatro experimentos a pequeña escala (1 g) para ver que la reacción era reproducible y posteriormente se llevó a cabo la reacción a una escala mayor (8 g).

El análisis de la composición de la síntesis de GOS a partir de Lactozym y de los isomerizados de GOS con aluminato sódico y ácido bórico se hizo mediante cromatografía de gases tal como se detalla en el apartado 2.2.2.4.3.

2.2.2. Solubilidad de carbohidratos

2.2.2.1. Solubilidad en alcoholes a presión atmosférica

2.2.2.1.1. Preparación de muestra

2.2.2.1.1.1. Monosacáridos y disacáridos

Se midieron las solubilidades de diferentes aldosas (glucosa, galactosa y lactosa) y cetosas (fructosa, tagatosa y lactulosa) en cuatro alcoholes diferentes (metanol, etanol, isopropanol y *n*-propanol) a 22, 30 y 40 °C.

Para ello, se pesó un ligero exceso de cada carbohidrato –con respecto a su solubilidad esperada- en una balanza analítica con 0.1 mg de precisión. Posteriormente, se añadieron 5 mL de cada uno de los alcoholes (conservados sobre tamiz molecular para evitar la presencia de agua) a cada uno de los viales que contenían los carbohidratos y se sellaron. La precisión de las medidas de temperatura fue de ± 0.1 °C.

Los viales se agitaron a 150 rpm a las temperaturas experimentales durante 48 horas y posteriormente se dejaron en reposo a esas mismas temperaturas para permitir que los sólidos finos dispersos sedimentaran.

El tiempo necesario hasta alcanzar el equilibrio y para que el exceso de carbohidratos sedimentara, se estableció en experimentos previos midiendo la solubilidad cada 24 horas. Se consideró que el equilibrio se había alcanzado, cuando la diferencia del valor de solubilidad entre dos intervalos de 24 horas era menor que el error experimental para el método de cromatografía de gases empleado en este trabajo (5 %).

Las medidas de solubilidades se realizaron por triplicado, oscilando la desviación media para los valores de solubilidad entre 0.7 % y 2.4 %.

La determinación de la solubilidad se realizó analizando el contenido en carbohidratos mediante cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 2.2.2.4.3.

2.2.2.1.1.2. Vivinal GOS®

La solubilidad de la mezcla comercial de GOS se determinó a 22, 30 y 40 °C en mezclas etanol/agua en diferentes proporciones. En primer lugar se determinó la solubilidad de la mezcla comercial de GOS en una mezcla etanol/agua 70:30 (v/v) mediante la realización de diferentes experimentos cada uno de ellos con una cantidad determinada de mezcla comercial de GOS previamente liofilizado. Este experimento

permitió conocer la solubilidad máxima (se empleó etanol al 70%) de la mezcla comercial de GOS.

Para realizar estas medidas se añadió un ligero exceso de la mezcla comercial de GOS pesado en una balanza analítica con 0.1 mg de precisión. Posteriormente se añadieron 10 mL de la mezcla etanol/agua (% v/v) bajo estudio. Los viales se sellaron y fueron agitados en un fermentador a 150 rpm a temperatura constante (22, 30 o 40 °C dependiendo del experimento) durante 48 horas. Posteriormente se dejaron en reposo a esas mismas temperaturas, 24 horas, para permitir que los sólidos finos dispersos sedimentaran. La precisión de la medida de temperatura fue de 0.1 °C.

2.2.2.1.1.2.1. *Diseño experimental para las medidas de solubilidad de Vivinal GOS®*

Los efectos de dos factores, el contenido en agua en la mezcla etanol/agua y la temperatura experimental usando un diseño factorial (2 niveles) completo, fueron examinados como afectaban a la solubilidad (mg/mL) de los monosacáridos, disacáridos y trisacáridos. El diseño experimental elegido fue un diseño de caras centradas (CCF del inglés central composite face) con combinaciones de todos los factores. Los efectos principales y todas las interacciones (con una repetición para cada experimento) fueron realizados en orden aleatorio, en total se llevaron a cabo 40 experimentos (ver TablaII-1).

Tabla II-1. Matriz del diseño experimental.

Factores estudiados		
Exp. No.	Etanol/Agua (v/v)	T (°C)
1	91.34/8.66	37.36
2	70/30	30
3	91.34/8.66	24.63
4	82.5/17.5	40
5	82.5/17.5	30
6	73.66/26.34	37.36
7	82.5/17.5	22
8	95/5	30
9	82.5/17.5	30
10	73.66/26.34	24.63
11	91.34/8.66	37.36
12	70/30	30
13	91.34/8.66	24.63
14	82.5/17.5	40
15	82.5/17.5	30

16	73.66/26.34	37.36
17	82.5/17.5	22
18	95/5	30
19	82.5/17.5	30
20	73.66/26.34	24.63
Fuera del diseño experimental		
	70/30	40

Los parámetros del modelo fueron estimados por regresión lineal múltiple (MLR) usando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV v.15.2.00. Este programa permite el diseño y análisis de diseños experimentales.

2.2.2.2. Solubilidad en CO_2 supercrítico

2.2.2.2.1. Preparación de muestra

Se llevaron a cabo una serie de experimentos para conocer las solubilidades de lactosa, lactulosa, galactosa y tagatosa en diferentes condiciones supercríticas usando como modificador etanol/agua 95:5 v/v.

Se pesaron 100 mg de cada carbohidrato por separado, a excepción de la tagatosa para la que se pesaron 250 mg, en una balanza analítica. Se añadió arena de mar en la proporción (1 parte de carbohidrato y 9 de arena de mar, a excepción de las muestras de tagatosa donde la relación era 2.5 partes de carbohidrato y 9 partes de arena de mar) y se homogeneizó la muestra con ayuda de un molino de cuchillas (Janke & Kunkel IKA A-10). La arena de mar se eligió como material inerte para mantener la muestra dentro de la celda de extracción y mejorar la eficiencia de ésta evitando que se formaran trayectorias de flujo preferentes. Todos los componentes se pesaron en una balanza analítica (AB-104 Mettler Toledo).

La muestra se situó en el interior de la celda de extracción empleando lana de vidrio para rellenar el volumen libre de la celda. De esta manera, la distribución de muestra en la celda era la siguiente: lana de vidrio en el extremo inferior de la celda, mezcla homogénea del carbohidrato al cual se le iba a determinar su solubilidad supercrítica y arena en el centro y otra vez lana de vidrio en el extremo superior como se muestra en la Figura II-1.

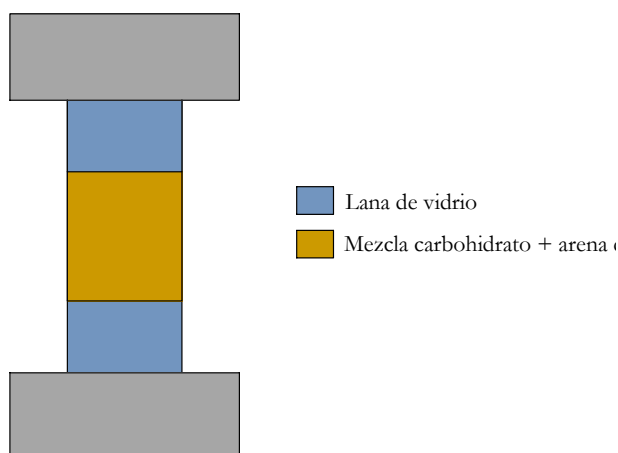


Fig. II-1.-Distribución de la muestra en la celda.

2.2.2.2. Descripción del sistema

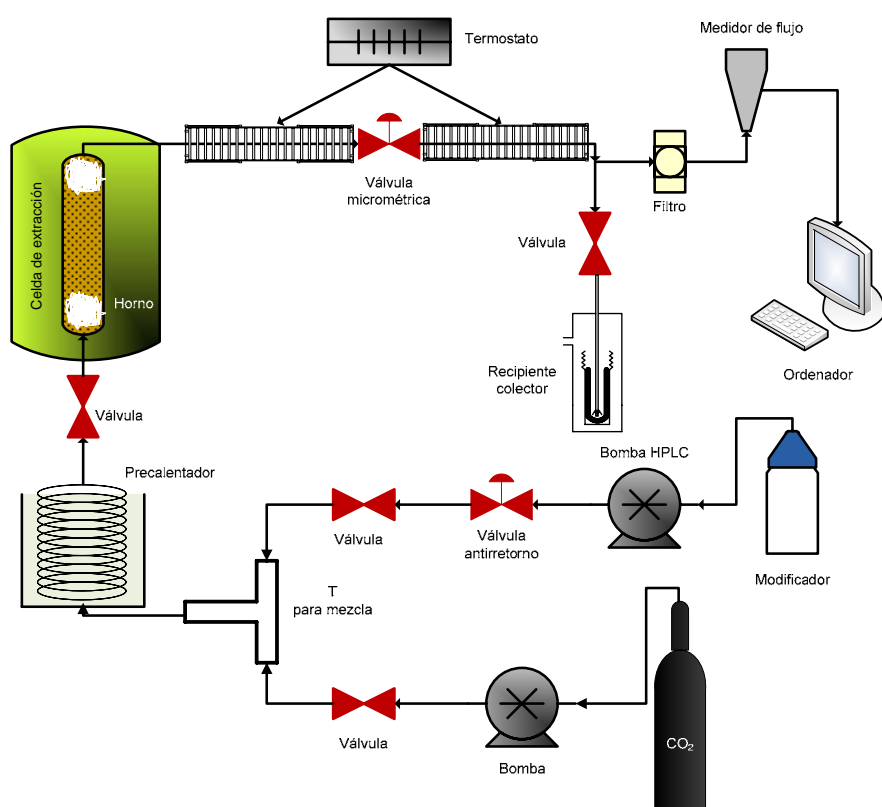


Fig. II-2.-Esquema del sistema de extracción supercrítica empleado.

La Figura II-2 muestra el diagrama del extractor por fluidos supercríticos empleado para llevar a cabo los experimentos. El sistema está basado en un extractor Suprex

PrepMaster con varias modificaciones y posee un horno termostatzado calentado por convección de aire donde se coloca la celda de acero inoxidable con la muestra. El CO₂ se bombeó al sistema empleando la bomba del equipo Suprex PrepMaster. Se utilizó una bomba de HPLC (HPLC pump Waters 510) para introducir el modificador en el sistema de extracción.

Después de la bomba se colocó una válvula antirretorno (Swagelok SS-CHS2-BU-10), para evitar la entrada de CO₂ a la bomba de modificador que pudiera dañar el sistema. Los dos fluidos se mezclaron en un dispositivo diseñado especialmente para favorecer el mezclado de ambos a la vez que garantizaba que el fluido alcanzaba la temperatura de extracción previo a su entrada en la celda mediante su paso por un tubo de acero de dimensiones apropiadas en forma de espiral situado en un baño de glicerina (JP Selecta Agimatic N) a la temperatura de trabajo.

A la salida de la celda de extracción se colocó una válvula micrométrica (Swagelok SS-SS4-BU-VH) para el control fino del flujo a través de la celda.

Las líneas que conectaban la celda a la válvula micrométrica y ésta al sistema de recogida de extracto se calentaron con ayuda de una cinta calefactora para evitar la precipitación de los compuestos extraídos.

El sistema de despresurización empleado se muestra en la Figura II-3 y fue especialmente diseñado (224) para evitar las pérdidas de los solutos volátiles extraídos, debido a la despresurización rápida del sistema. Como se puede observar, el recipiente está compuesto por dos cuerpos de acero inoxidable que se ajustan de forma hermética para evitar pérdidas en el sistema y, en su interior, se sitúa un vial de 30 mL reemplazable donde se depositan los extractos durante la extracción.

Para llevar a cabo la medida de forma precisa y controlable del flujo másico de CO₂ (gas) que circula por el sistema, se adaptó un medidor de flujo másico controlado por ordenador (EL-FLOW[®] Mass Flow Meter/Controller F-111C) que permitió ajustar el flujo de CO₂ a los valores seleccionados para cada experimento.

Una vez alcanzadas las condiciones experimentales de presión y temperatura, el disolvente de extracción (consistente en una mezcla de CO₂ y modificador) se hacía pasar a través de la celda durante 2 horas. El flujo de CO₂ fue de 1.2 g/min, constante en todos los experimentos realizados.

Para los experimentos donde se determinaban las solubilidades en condiciones supercríticas de los diferentes carbohidratos, una vez alcanzadas las condiciones experimentales (combinando 100, 200 y 300 bar, con 60 y 100 °C y 0.2 y 0.6 mL/min de flujo de modificador, todo ello para cada carbohidrato), el disolvente pasaba a través de la celda durante dos horas, pero cada veinte minutos, los extractos se recogían en el sistema descrito anteriormente.

Los extractos recogidos se pesaban en una balanza analítica.

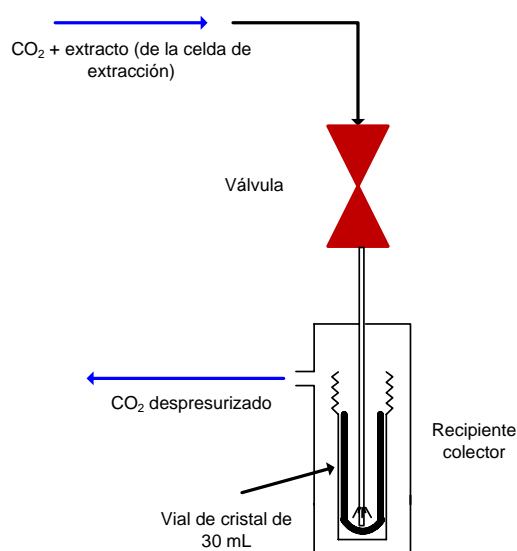


Fig. II-3.-Esquema del dispositivo para la recogida de extractos después de la extracción supercrítica.

2.2.2.2.3. *Determinación de las solubilidades de los distintos carbohidratos en condiciones supercríticas*

Para determinar el peso seco de la muestra recogida, 750 μL de los extractos recogidos se secaron en viales de 4 mL y mediante centrifugación a vacío durante 24 horas en un concentrador SpeedVac conectado a una trampa de condensación. La diferencia de peso del vial vacío y después de secar la muestra, es lo que se consideró el peso seco para calcular posteriormente la solubilidad. Las diferencias de pesos de los viales se obtuvieron empleando una balanza analítica (AB-104 Mettler Toledo).

Se representó la cantidad de carbohidrato extraído frente a la cantidad de disolvente supercrítico empleado (CO_2 + modificador), a diferentes tiempos de extracción (al menos cuatro valores). La solubilidad se calculó como el valor de la pendiente de la correspondiente regresión lineal. Los errores en las medidas de las solubilidades se calcularon tomando el coeficiente de regresión obtenido en cada caso.

2.2.2.3. *Fraccionamiento de mezclas de carbohidratos con CO_2 supercrítico*

2.2.2.3.1. *Preparación de muestra*

2.2.2.3.1.1. *Preparación de mezclas binarias de carbohidratos*

Los procesos de extracción se llevaron a cabo con mezclas binarias lactulosa-lactosa y tagatosa-galactosa, para ello se siguió el siguiente procedimiento:

1) Primero se mezclaron íntimamente los carbohidratos en proporciones 70:30 (cetosa:aldosa), por ser ésta la relación que se obtiene en la reacción de isomerización, de ambas aldosas y también 30:70 para la mezcla tagatosa-galactosa, con ayuda de un molino de cuchillas; 2) la mezcla homogénea obtenida se mezcló, posteriormente y tal como se ha descrito en el apartado anterior, con arena de mar en una proporción de 1 parte de muestra (100 mg) y 9 partes de arena de mar. Todos los componentes se pesaron en una balanza analítica (AB-104 Mettler Toledo).

La muestra se situó en el interior de la celda de extracción empleando lana de vidrio para rellenar el volumen libre de la celda, tal como se ha detallado en el apartado 2.2.2.2.1.

2.2.2.3.1.2. Preparación de isomerizados de GOS

Las muestras en solución acuosa se liofilizaron obteniéndose muestras sólidas para su posterior fraccionamiento en condiciones supercríticas. Una vez obtenida la muestra sólida se homogeneizó con un molino de cuchillas hasta quedar en forma pulverulenta y se mezcló en diferentes proporciones muestra/arena de mar (tal como se explicó en el apartado 2.2.2.3.1.1.). La mezcla y colocación de la muestra se llevó a cabo de la misma manera que ha sido descrita en el apartado 2.2.2.2.1.

2.2.2.3.1.3. Preparación de Vivinal GOS[®]

Vivinal GOS[®] en solución acuosa se liofilizó y una vez obtenida la muestra sólida se homogeneizó con un molino de cuchillas hasta quedar en forma pulverulenta y se mezcló en diferentes proporciones de Vivinal GOS[®] con arena de mar (tal como se explicó en el apartado 2.2.2.3.1.1.). Se llevaron a cabo experimentos donde la arena de mar fue sustituida por anillos Fenske o perlitas de cristal (Figura II-4a y II-4b). La colocación de la muestra se llevó a cabo de la misma manera que ha sido descrita en los apartados en el apartado 2.2.2.2.1.



Figura II-4a. Anillos Fenske

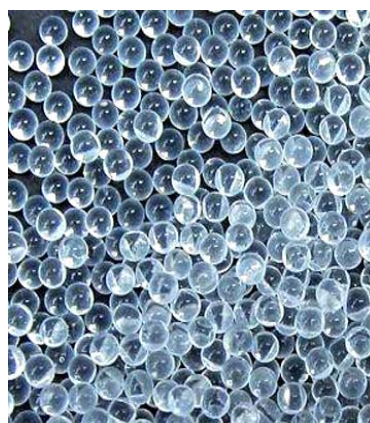


Figura II-4b. Perlitas de cristal

2.2.2.3.2. Descripción del sistema

El sistema empleado para llevar a cabo las extracciones de las mezclas lactulosa/lactosa y tagatosa/galactosa, del Vivinal GOS[®] y de los isomerizados de GOS fue el mismo que ha sido descrito en el apartado 2.2.2.2.2.

2.2.2.3.3. Diseño experimental para las extracciones supercríticas de mezclas binarias cetosa/aldosa

Se estudiaron los efectos de tres factores, presión de extracción (P), temperatura de extracción (T) y flujo del modificador (M) sobre las cantidades de carbohidratos extraídas.

2.2.2.3.3.1. Mezclas lactulosa/lactosa

El efecto de los tres factores se estudió mediante un diseño factorial completo (2 niveles). El diseño fue ortogonal (equilibrado) considerando todas las combinaciones de los tres factores. Se llevaron a cabo un total de 11 experimentos: 8 pertenecientes a todas las combinaciones de los factores del diseño factorial 2^3 y un punto central, realizado por triplicado para establecer el error experimental. Usando este diseño, las tres variables se analizaron a dos niveles experimentales diferentes: presión de extracción a 100 y 300 bar, temperatura de extracción a 60 y 100 °C y flujo de modificador a 0.2 y 0.4 mL/min. El punto central para este diseño correspondió a 200 bar, 80 °C y 0.3 mL/min.

Las variables respuesta elegidas fueron la cantidad de lactosa (L_a) y lactulosa (L_u) extraídas y sus recuperaciones (en % de peso seco), expresadas como la relación entre la cantidad extraída de cada carbohidrato y la cantidad del carbohidrato en la muestra inicial. La Tabla II-2 muestra la matriz del diseño experimental empleado.

El modelo propuesto para cada variable respuesta (Y_i) fue:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 T + \beta_3 M + \beta_{1,2} P*T + \beta_{1,3} P*M + \beta_{2,3} T*M + \varepsilon_i \quad (\text{Ecuación II-1})$$

donde β_0 es la ordenada en el origen; β_1 , β_2 y β_3 son los coeficientes lineales; $\beta_{1,2}$, $\beta_{1,3}$ y $\beta_{2,3}$ son los coeficientes de interacción; y ε_i es el error. Los parámetros del modelo se estimaron por regresión lineal múltiple usando el programa estadístico Statgraphics Plus v.5.1, este programa permite la creación y análisis de diseños experimentales.

Tabla II-2. Matriz del diseño experimental.

Exp. No.	Factores estudiados		
	P (bar)	T (°C)	M (mL/min)
1	100	60	0.2
2	300	60	0.2
3	100	100	0.2
4	300	100	0.2
5	100	60	0.4
6	300	60	0.4
7	100	100	0.4
8	300	100	0.4
9	200	80	0.3
10	200	80	0.3
11	200	80	0.3

El experimento 5 fue excluido del análisis estadístico porque a esas condiciones se formaban dos fases (líquido-vapor), por lo tanto el disolvente de extracción no se encontraba en una fase homogénea. El resto de combinaciones P - T - M se llevaron a cabo en una única fase, sin limitaciones experimentales, por lo que parecía razonable pensar que algún modelo matemático se ajustaría al fraccionamiento de disacáridos bajo condiciones de extracción supercrítica.

El efecto de cada término en el modelo y su significación estadística, para cada una de las variables respuestas, se analizaron mediante el diagrama de Pareto estandarizado. Los términos no significativamente diferentes de cero ($p > 0.05$) se excluyeron del modelo, y éste se reajustó por regresión lineal múltiple.

La bondad del ajuste del modelo matemático se evaluó usando el coeficiente de determinación (R^2), la desviación estándar residual (RSD) y, a partir del test ANOVA, la falta de ajuste del modelo. La falta de ajuste se emplea para determinar si el modelo elegido es adecuado para describir los valores experimentales, o si se debe elegir otro modelo más

complejo. Del modelo reajustado se obtuvieron las representaciones de las superficies de respuesta y las condiciones óptimas que maximizaban cada una de las variables respuesta.

2.2.2.3.3.2. Mezclas tagatosa/galactosa

El efecto de los tres factores seleccionados se estudió en una mezcla tagatosa-galactosa, empleando un diseño de caras centradas (CCF del inglés central composite face). Se llevaron a cabo un total de 17 experimentos (Tabla II-3), 2^3 puntos del diseño factorial, seis puntos estrella situados en las caras de los lados (polígono de dos dimensiones que forma uno de los lados de una figura tridimensional) y 3 puntos centrales para verificar el error experimental. Usando este diseño, se analizaron las tres variables a tres condiciones experimentales diferentes: presión de extracción a 100, 200 y 300 bar, temperatura de extracción a 60, 80 y 100 °C y flujo de modificador a 0.2, 0.3 y 0.4 mL/min. Las variables respuesta elegidas fueron la cantidad de tagatosa (Ta) y galactosa (Ga) extraídas y sus recuperaciones (en % de peso seco), expresadas como la relación entre la cantidad extraída de cada carbohidrato y la cantidad del carbohidrato en la muestra inicial. El experimento 5 fue excluido del análisis estadístico por el mismo motivo que ya se ha mencionado en el apartado anterior para la mezcla lactosa-lactulosa.

Tabla II-3. Matriz del diseño experimental.

Exp. No.	Factores estudiados		
	P (bar)	T (°C)	M (mL/min)
1	100	60	0.2
2	300	60	0.2
3	100	100	0.2
4	300	100	0.2
5	100	60	0.4
6	300	60	0.4
7	100	100	0.4
8	300	100	0.4
9	100	80	0.3
10	300	80	0.3
11	200	60	0.3
12	200	100	0.3
13	200	80	0.2
14	200	80	0.4
15	200	80	0.3
16	200	80	0.3
17	200	80	0.3

El modelo cuadrático propuesto para cada una de las variables (Y_i) fue:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 T + \beta_3 M + \beta_{1,1} P^2 + \beta_{2,2} T^2 + \beta_{3,3} M^2 + \beta_{1,2} P \cdot T + \beta_{1,3} P \cdot M + \beta_{2,3} T \cdot M + \varepsilon \quad (\text{Ecuación II-2})$$

donde β_0 es la ordenada en el origen; β_i es el coeficiente de primer orden; β_{ij} son los coeficientes cuadráticos para la variable i ésima; y ε es el error variable. Los parámetros del modelo se estimaron por regresión lineal múltiple usando el programa estadístico Statgraphics Plus v.5.1.

Los análisis estadísticos posteriores para la mezcla tagatosa-galactosa fueron los mismos que los realizados para la mezcla lactulosa-lactosa. La única variación se produjo en el reajuste del modelo matemático, donde los términos no significativamente diferentes de cero con una probabilidad del 90 % ($p > 0.10$) se excluyeron del modelo. Además, para la comparación de medias se utilizó un test t de dos muestras (Statgraphics Plus v.5.1.).

2.2.2.4. *Análisis de carbohidratos mediante cromatografía de gases*

2.2.2.4.1. *Preparación de las muestras*

500 μ L de la muestra obtenida en los diferentes experimentos fue añadida a 0.5 mL de una solución de 0.01 % (w/v) de fenil- β -D-glucósido en metanol/agua (70:30, v/v) como patrón interno. Y la mezcla se evaporó a sequedad en un rotavapor R-200 a 38-40 °C.

2.2.2.4.2. *Preparación de trimetil-silil derivados*

Previo al análisis de las muestras por cromatografía de gases, éstas se derivatizaron para formar los silil derivados, que posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Se emplearon tres métodos diferentes según el tipo de muestra a inyectar.

2.2.2.4.2.1. *De carbohidratos*

2.2.2.4.2.2. *Con N-trimetilsililimidazol*

Este método de derivatización fue empleado para las muestras que contenían lactulosa, lactosa o mezclas lactulosa/lactosa.

Para ello, 500 μL de las muestras previamente llevadas a sequedad se les añadió 100 μL de N-trimetilsililimidazol y se dejó reaccionar 30 minutos a 65 °C (225). Los carbohidratos sililados fueron extraídos con 0.1 mL de hexano y 0.2 mL de agua. Entre 1 y 2 μL de volumen de la fase orgánica que contenía los derivados sililados, se inyectaron en la columna.

2.2.2.4.2.3. Con piridina, N-trimetilsililimidazol y trimetilclorosilano

Este método de derivatización fue empleado para las muestras que contenían glucosa, fructosa, tagatosa, galactosa y mezclas tagatosa/galactosa. Se prepararon los trimetilsilil (TMS) derivados por un método diferente que para la lactosa y la lactulosa porque se comprobó en el laboratorio que la desviación estándar relativa de los TMS derivados de monosacáridos empleando trimetilsililimidazol era muy alta y se mejoraba empleando este método de sililación. En el caso de los disacáridos ambos métodos daban resultados similares y por ello se empleó el método de sililación más sencillo.

A los 500 μL de las muestras previamente llevadas a sequedad se les añadió 100 μL de piridina, 100 μL N-trimetilsililimidazol y 100 μL de clorotrimetilsilano; la reacción se llevó a cabo de forma instantánea a temperatura ambiente (226). Los carbohidratos sililados fueron extraídos con 0.1 mL de hexano y 0.2 mL de agua. Entre 2 y 3 μL de volumen de la fase orgánica que contenía los derivados sililados, se inyectaron en la columna del cromatógrafo.

2.2.2.4.2.4. De oximas

Este método de derivatización fue empleado para las muestras de Vivinal GOS[®] y los isomerizados de GOS.

Las oximas de los carbohidratos (227) se formaron añadiendo a los 500 μL de las muestras previamente llevadas a sequedad 350 μL de cloruro de hidroxilamina (2.5 %) en piridina y calentando la mezcla a 70 °C durante 30 minutos. Posteriormente, las oximas obtenidas en el paso anterior se sililaron con hexametildisilazano (350 μL) y ácido trifluoroacético (35 μL) y se mantuvieron a 50 °C durante 30 minutos (228). La mezcla de reacción se centrifugó a 7000 x g durante 10 minutos (229, 230). Los sobrenadantes se inyectaron en el cromatógrafo de gases o se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.

2.2.2.4.3. Condiciones cromatográficas

Los análisis se realizaron en cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD HP 6890 GC SERIES equipado con un detector por ionización de llama (FID) y utilizando

nitrógeno como gas portador. Los trimetilsilil éter y las trimetilsilil oximas se separaron usando una columna capilar de sílice fundida SPB™-17 de 30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno (237). Las inyecciones se realizaron en split 1:40.

Los programas utilizados para los distintos análisis se muestran en la Figura II-5.

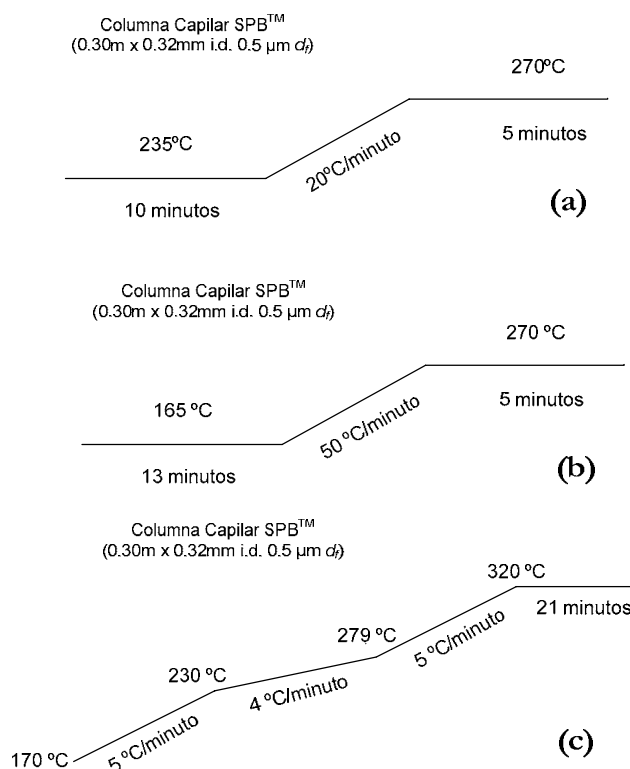


Fig. II-5.-Programas utilizados para la separación de trimetil silil éteres de: (a) lactosa, lactulosa y sus mezclas; (b) monosacáridos y sus mezclas; (c) Vivinal GOS® e isomerizados de galactooligosacáridos.

2.2.2.5. Análisis de aluminio por ICP-MS

La cantidad de aluminio presente en las muestras extraídas se determinó en el Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid en un equipo automático de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Elan 6000 Perkin-Elmer Sciex equipado con autosampler AS 91. Para realizar el análisis de aluminio en los extractos recogidos, se evaporó la muestra disuelta en etanol/agua 95:5 v/v y se resuspendió en agua. Las muestras fueron depositadas en tubos de polipropileno y antes de inyectarlas se diluyeron en un medio de ácido nítrico al 1 %. Este análisis ofrece una medida precisa de los elementos presentes en la muestra y sus concentraciones. Se utilizó rodio como patrón interno.

2.2.2.6. *Análisis de boro por ICP-MS y espectrometría UV-VIS*

El análisis de boro se llevó a cabo por dos métodos diferentes: 1) ICP-MS: de la misma manera que se llevó a cabo para la determinación de aluminio en el apartado 2.6.2.; y 2) Espectrometría UV-VIS: La espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopia de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

La espectroscopia UV-visible se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. Para la determinación de boro se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS BECKMAN-COULTER DU 800.

El método empleado para determinar el boro en los extractos supercríticos fue el establecido por el BOE número 246 de 14/10/1981 en su orden de 17 de septiembre de 1981 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, aguas, carnes y productos cárnicos, fertilizantes, productos fitosanitarios, leche y productos lácteos, piensos y sus primeras materias, productos orgánicos fertilizantes, plantas, suelos, productos derivados de la uva y similares y toma de muestras.

El principio en el que se basa este método es en la acidificación y evaporación de la muestra en presencia de curcumina, formación de un compuesto de color rojo y posterior medida espectrofotométrica de color desarrollado previa disolución en etanol.

El procedimiento seguido es en primer lugar la obtención de la curva de calibrado. Para ello se introdujeron en cápsulas de evaporación del mismo tipo y tamaño 0, 0,25; 0,50; 0,75 y 1.0 mL de solución patrón de boro (1 µg de boro por mililitro de agua desmineralizada). Se añadió agua desmineralizada a cada cápsula para obtener un volumen total de 1 mL. Se agregaron 4.0 mL de reactivo de curcumina. El reactivo de curcumina estaba formado por 40 mg de curcumina y 5 g de ácido oxálico disuelto en 80 mL de etanol al 95 %. Finalmente se añadieron 4 mL de ácido clorhídrico concentrado y se llevaron a 100 mL de etanol de 95%.

Todas las cápsulas se mezclaron cuidadosamente y se colocaron a evaporar en un baño de agua a 55 °C, manteniendo los residuos a esta temperatura durante 30 minutos en estufa. Se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y añadió etanol al 95% y se disolvió triturando, y se llevó a matraz aforado completando a 25 mL. Se filtraron las soluciones por filtro de papel lento (Whatman 30 o equivalente). Se llevó una parte de los filtrados a la cubeta del instrumento de medida y se leyó a 546 nm dentro de la primera hora subsiguiente al secado. Con los datos obtenidos se construyó la curva patrón.

Para la determinación de boro en las muestras se tomó 1 mL de la muestra y se operó exactamente igual que para la obtención de la curva de calibrado.

2.2.2.7. Análisis de azufre por ICP-MS

El análisis de azufre se llevó a cabo por ICP-MS de la misma manera que se llevó a cabo para la determinación de aluminio en el apartado 2.2.2.5.

2.2.2.8. Modelado termodinámico

2.2.2.8.1. A presión atmosférica

Se propone un modelo termodinámico para predecir el comportamiento de la solubilidad de los diferentes carbohidratos en diferentes alcoholes, incluso en mezclas alcohol-alcohol y alcohol-agua.

Para ello hemos asumido que el agua no está presente en la fase sólida de los carbohidratos y que no hay dependencia de la temperatura para ΔC_p (diferencia entre la capacidad calorífica de líquido puro y del carbohidrato sólido), la fracción molar anhidra del azúcar x_s en la fase líquida (por ejemplo la solubilidad del azúcar) puede calcularse usando la siguiente expresión:

$$\ln(x_s / \gamma_s) = -\frac{\Delta H_m}{RT_m} \left(\frac{T_m}{T} - 1 \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \left(\frac{T_m}{T} - 1 \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \quad (\text{Ecuación II-3})$$

donde T_m y ΔH_m son, respectivamente, la temperatura de fusión del carbohidrato y su entalpía, mientras que γ_s es su coeficiente de actividad en la fase líquida alcohólica. Por eso, para calcular la solubilidad de los carbohidratos, se necesitan las propiedades físicas de los azúcares puros y un modelo termodinámico para calcular γ_s . Los valores de T_m , ΔH_m y ΔC_p para los seis carbohidratos puros estudiados aparecen en la Tabla II-4.

Tabla II-4. Propiedades físicas de los carbohidratos (207).

	T_m (K)	ΔH_m (J/mol)	ΔC_p (J/mol K)
Glucosa	423.15	32248	120
Fructosa	378.15	26030	120
Galactosa	436.15	43778	120
Tagatosa	407.15 ^a	29700 ^b	120
Lactosa	474.15	75306	239
Lactulosa	442.15 ^a	57506 ^b	239

^a www.sigmaaldrich.com

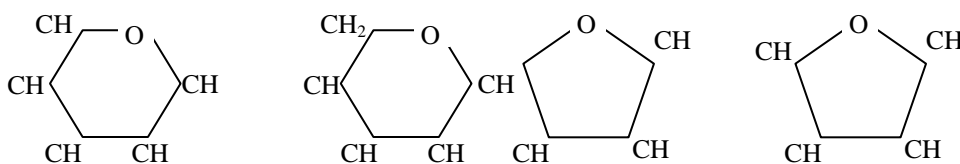
^b estimados por el método de Jain *et al* (232).

Considerando el cálculo de coeficiente de actividad de agua en la fase acuosa (γ_s), el modelo A-UNIFAC se usó para representar los datos de solubilidad medidos experimentalmente. Además se estudió la capacidad del modelo para predecir solubilidades de azúcares en sistemas ternarios azúcar-álcohol-álcohol y azúcar-álcohol-agua. Las ecuaciones del modelo A-UNIFAC empleadas aparecen en el Anexo 1, donde se da también una explicación detallada del modelo (207, 233).

La composición de los grupos de los diferentes carbohidratos fue definida por Ferreira *et al.* (207) introduciendo los tres grupos principales para representar las moléculas de los diversos azúcares. En este sentido los grupos principales son:

- anillo del carbohidrato (anillo piranósido *PYR* o furanósido *FUR*).
- grupo hidroxilo unido al anillo del carbohidrato (OH_{ring}).
- enlace osídico ($—O—$).

Además, el anillo de carbohidrato tiene cuatro subgrupos:



Teniendo en cuenta estos grupos principal y subgrupos, la composición del grupo de carbohidratos para nuestro estudio es la que se muestra en la Tabla II-5.

Tabla II-5. Composición del grupo de carbohidratos.

	<i>PYR1</i>	<i>PYR2</i>	<i>FUR1</i>	<i>FUR2</i>	CH_2	$—O—$	OH_{ring}	p^{OH}
Glucosa	1	0	0	0	1	0	5	2.6
Fructosa	0	1	0	0	1	0	5	2.6
Galactosa	1	0	0	0	1	0	5	2.4
Tagatosa	0	1	0	0	1	0	5	2.4
Lactosa	2	0	0	0	2	1	8	4.3
Lactulosa	1	0	1	0	3	1	8	4.3

Aunque la glucosa y la galactosa son isómeros (ídem para fructosa y tagatosa) y tienen exactamente la misma composición de grupo, el modelo A-UNIFAC distingue entre esas moléculas considerando un número diferente de grupos hidroxilos asociativos (p^{OH}) para cada isómero. Por razones estéricas, sólo una parte del número de grupos reales de OH_{ring} presentes en la estructura química del azúcar pueden asociarse realmente.

2.2.2.8.2. En condiciones supercríticas

Para calcular la solubilidad (fracción molar) de los carbohidratos sólidos en la fase fluida a una temperatura, presión y composición determinada, se necesita un modelo termodinámico adecuado. Además, adoptando una ecuación de estado (EoS, del inglés Equation of State) para la fase fluida y denotando por el superíndice “S” el soluto sólido y por el superíndice “F” la fase fluida, la condición de equifugacidad para el soluto es:

$$f^{\text{S}}(T, P) = f^{\text{F}}(T, P, \mathbf{y}, V)$$

Donde f^{S} es la fugacidad del soluto en la fase sólida, f^{F} es la fugacidad del soluto en la solución de la fase fluida, $\mathbf{y} = (y_1, y_2, \dots, y_{\text{Nc}})^{\text{T}}$ el vector de las fracciones molares de la fase fluida y V es el volumen molar del fluido de la EoS. Además, se debe cumplir que la suma de las fracciones molares en la fase fluida debe ser 1.

Si la fugacidad de una hipotética fase líquida subenfriada (a temperatura inferior a la de saturación a la presión dada) es usada como referencia en la fugacidad de la fase sólida (234-237), entonces la función fugacidad en la fase sólida, para la fase sólida de un soluto puro a una temperatura T y a una presión P y haciendo caso omiso al cambio de calor específico debido a su efecto despreciable, se expresa como:

$$f^{\text{S}} = f^{\text{SCL}}(P, T) \exp \left(\int_{P_{\text{subl}}^{\text{S}}}^P \frac{V^{\text{S}} - V^{\text{SCL}}}{RT} dP + \frac{\Delta H_{\text{fus}}}{R} \left(\frac{1}{T_{\text{m}}} - \frac{1}{T} \right) \right) \quad (\text{Ecuación II-4})$$

Si asumimos implícitamente, que no hay transición en la fase sólido-sólido y el volumen específico del sólido en el estado líquido subenfriado V^{SCL} depende débilmente de la presión, la ecuación anterior se puede escribir como sigue:

$$f^{\text{S}} = f^{\text{SCL}}(P, T) \exp \left(\frac{(V^{\text{S}} - V^{\text{SCL}})}{RT} (P - P_{\text{subl}}^{\text{S}}(T)) + \frac{\Delta H_{\text{fus}}}{R} \left(\frac{1}{T_{\text{m}}} - \frac{1}{T} \right) \right) \quad (\text{Ecuación II-5})$$

En ambas ecuaciones, f^{SCL} es la fugacidad del líquido puro subenfriado, V^{S} es el volumen molar del sólido puro, ΔH_{fus} es la entalpía de fusión, $\Delta V_{\text{fus}} = V^{\text{S}} - V^{\text{SCL}}$ es el cambio de volumen, todas tomadas para el soluto en su punto triple. La fugacidad del líquido puro subenfriado es calculada de la EoS (238).

Es necesario remarcar que la primera parte del término exponencial de la ecuación II-5, $\Delta V_{\text{fus}} = V^S - V^{\text{SCL}}$, es importante a presiones elevadas y no debería eliminarse (237).

2.2.2.8.2.1. Modelado termodinámico

El modelo termodinámico aplicado es la ecuación cúbica de estado (CEoS) de Soave-Redlich-Kwong (SRK) con las reglas de mezclado modificadas de segundo orden de Huron-Vidal (MHV2) (239).

En nuestro caso nos basamos en incorporar el mS-UNIFAC de Tsavas *et al.* (240), una extensión del modelo de energía de exceso de Gibbs de Larssen *et al.* (241), a presión cero en el término atractivo a del CEoS de SRK:

$$q_1 \left(\alpha - \sum_{i=1}^{N_c} z_i \alpha_{ii} \right) + q_2 \left(\alpha^2 - \sum_{i=1}^{N_c} z_i \alpha_{ii}^2 \right) = \frac{g_{(P=0)}^E}{RT} + \sum_{i=1}^{N_c} z_i \ln \left(\frac{b}{b_{ii}} \right) \quad (\text{Ecuación II-6})$$

En esta ecuación, z_i es la composición de la fase en fracción molar y los parámetros adimensionales α y α_{ii} están relacionados con los parámetros de la mezcla y el componente puro como sigue:

$$\alpha = \frac{a_{\text{mix}}}{b_{\text{mix}} RT} \quad \text{y} \quad \alpha_{ii} = \frac{a_{ii}}{b_{ii} RT} \quad (\text{Ecuación II-7})$$

Los valores recomendados para q_1 y q_2 son, respectivamente, -0.478 y -0.0047.

El mS-UNIFAC (240) permite el modelado de la fase de equilibrio de mezclas de carbohidratos y derivados de carbohidratos tanto en agua como en otros disolventes introduciendo dos nuevos grupos principales UNIFAC, a saber el grupo CHOH de los carbohidratos y el grupo osídico CH-O-CH.

2.2.2.9. Software de simulación de procesos AspenOne® V7

Un simulador de procesos es una herramienta computacional construida con un lenguaje de programación, integrando una interfase que ayuda al usuario a efectuar diversas operaciones sobre un proceso determinado.

El simulador funciona principalmente para la creación de procesos en un ambiente de simulación, que tiene por objeto analizar las variables presentes en el mismo, desde la caracterización de las materias primas, hasta la determinación de los productos obtenidos además de las propiedades físicas, químicas y termodinámicas de las sustancias que intervienen en él.

Para el diseño y la simulación del proceso se ha empleado el software AspenOne® V7 versión 2008 de la empresa Aspen Tech. Este simulador es uno de los más completos y

poderosos a nivel mundial, ya que cuenta dentro de su estructura, con un gran número de equipos industriales.

Dentro de las muchas funciones de Aspen, se tiene la capacidad para no sólo simular un proceso dado, sino para hacer el diseño de los equipos y la configuración de los mismos para crear nuevos procesos y analizarlos de manera exhaustiva. Se pueden emplear datos termodinámicos, datos de equilibrio de fases, predicción de propiedades, especificaciones de diseño, análisis de propiedades,...

Para llevar a cabo el análisis económico, se efectuó la simulación del esquema seleccionado en el software Aspen Plus V7 con el fin de obtener la información mínima requerida para el dimensionamiento de los equipos y la determinación del consumo de fluidos de servicio. Los costos de capital, los costos de operación y los indicadores de factibilidad para los dos procesos se obtuvieron con ayuda del paquete Aspen Process Economic Analyzer, para las condiciones específicas de España.

Capítulo III: Resultados y Discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Solubilidades de carbohidratos en alcoholes a presión atmosférica

Como se ha comentado en los objetivos, la presente Tesis Doctoral se diseñó con el objetivo principal de obtener carbohidratos prebióticos mediante la tecnología de fluidos supercríticos para su uso como ingredientes alimentarios con funcionalidades específicas. A continuación se presentan los resultados obtenidos en las distintas etapas de este trabajo de investigación. Las etapas constituyen pequeños hitos que permiten avanzar en la consecución del objetivo final (ver Figura 0-1 en Presentación y Objetivos).

3.1. Solubilidades de carbohidratos en alcoholes a presión atmosférica

El primer objetivo parcial que se planteó fue la medida de la solubilidad de los carbohidratos de interés en diferentes alcoholes a presión ambiente y a diferentes temperaturas.

Las medidas de solubilidad de los carbohidratos se llevaron a cabo en alcoholes ya que al tratarse los carbohidratos de compuestos polares, su solubilidad se esperaba que fuera baja en CO₂ supercrítico puro (al menos en cantidades significativas), y, por tanto, sería imperativo añadir un modificador para mejorar el rendimiento de la extracción. Los alcoholes elegidos fueron metanol, etanol, *n*-propanol e isopropanol; estos alcoholes se esperaba que dieran los mejores resultados, ya que la elección de alcoholes con mayor longitud de cadena hidrocarbonada resultaría en solubilidades demasiado bajas. Además estos alcoholes suelen ser los más empleados en los procesos agroalimentarios, especialmente el etanol, que junto al isopropanol están incluidos en la legislación de la Unión Europea como disolventes no peligrosos (Directiva del Consejo 92/115/CEE, de 17 de diciembre, por la que se modifica por primera vez la Directiva 88/344/CEE y traspuesta al ordenamiento jurídico español por el Real Decreto 226/1994 de 11 de febrero).

Por tanto, el objetivo de este apartado fue la medida de las solubilidades de los distintos carbohidratos (glucosa, fructosa, lactosa, lactulosa, galactosa y tagatosa) y algunas de sus mezclas en diferentes alcoholes (metanol, etanol, *n*-propanol y isopropanol) a presión ambiente y a temperaturas de 22, 30 y 40 °C. Se emplearon estas temperaturas para ver si pequeños cambios de temperatura daban lugar a grandes cambios en las solubilidades de los carbohidratos.

Para la consecución de este objetivo se desarrolló el siguiente plan de trabajo (Figura III-1):

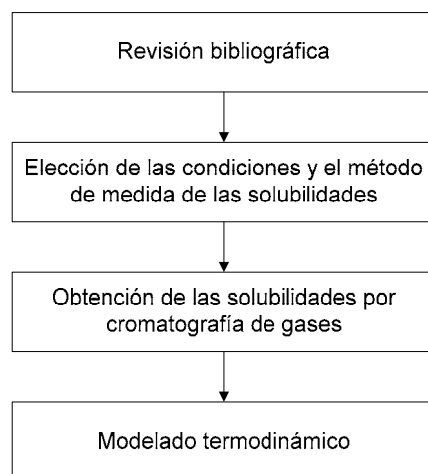


Fig. III-1.-Esquema de trabajo empleado para la medida de solubilidades.

En primer lugar se llevó a cabo una revisión bibliográfica para ver la información disponible y los métodos empleados para realizar esas medidas.

De acuerdo a la información obtenida y a los medios disponibles, se eligieron las condiciones y el método de trabajo para la medida de las solubilidades de los carbohidratos en los alcoholes que se detallan en el apartado 2.2.2.1. correspondiente de Materiales y Métodos. Se realizaron los experimentos, se obtuvieron los valores de solubilidad mediante el análisis de las muestras por cromatografía de gases (apartado 2.2.2.4.3. de Materiales y Métodos) y se ajustaron los valores obtenidos al modelo termodinámico A-UNIFAC.

3.1.1. Resultados y discusión

3.1.1.1. Medida experimental de las solubilidades de los azúcares y sus mezclas

Se midió la solubilidad de glucosa, galactosa, lactosa y sus correspondientes cetosas, fructosa, tagatosa y lactulosa y de las mezclas lactosa/lactulosa y galactosa/tagatosa en metanol, etanol, *n*-propanol e isopropanol a 22, 30 y 40 °C. Los resultados se muestran en las Tablas III-1 (para los carbohidratos puros) y III-2 (para las mezclas) y vienen expresados en g/L. Como era de esperar, la solubilidad aumenta con la temperatura y disminuye al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol. También hay que tener en cuenta el hecho que, por lo general, la solubilidad de las cetosas es mayor que las correspondientes aldosas. La Figura III-2 muestra la solubilidad relativa cetosa/aldosa a 40 °C en los diferentes alcoholes (calculado como el cociente de las solubilidades de las cetosas y sus correspondientes aldosas).

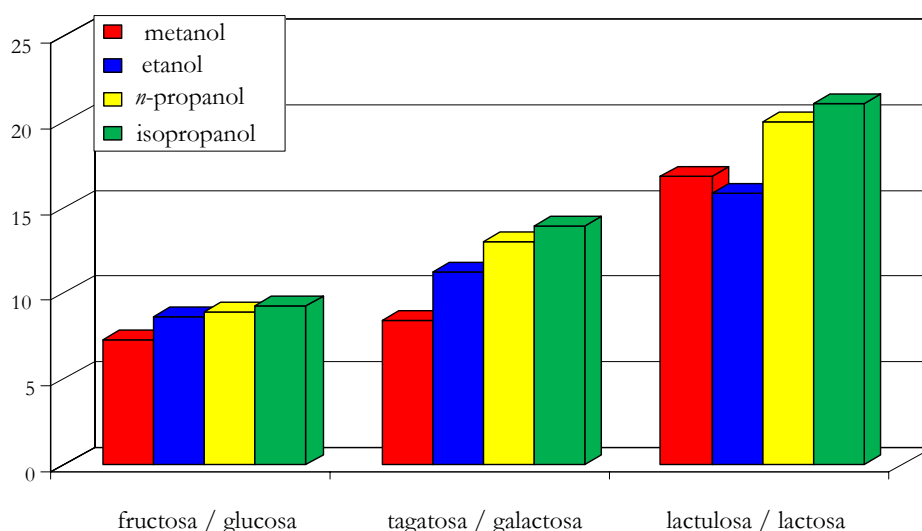


Fig. III-2.-Solubilidad relativa cetosa/aldosa en diferentes alcoholes a 40 °C.

Se obtuvieron valores superiores a 5 para todos los alcoholes estudiados. Por lo tanto, es de esperar que puedan extraerse selectivamente cetosas en SCCO_2 si se añaden diferentes cantidades de alcohol como modificador. Además, para todos los carbohidratos estudiados, la solubilidad es mayor en isopropanol que en *n*-propanol. Se empleó el test ANOVA para estudiar la significación estadística de las diferencias halladas en las solubilidades más bajas que se muestran en la Tabla III-1 y III-2, es decir, la solubilidad de lactosa en 1-propanol e isopropanol. Los resultados mostraron que los valores de solubilidad podían considerarse diferentes entre ellos.

Tabla III-1. Solubilidades experimentales (g/L) de los diferentes carbohidratos en los distintos alcoholes a 22, 30 y 40 °C.

	Metanol			Etanol			Isopropanol			n-Propanol		
	22 °C	30 °C	40 °C	22 °C	30 °C	40 °C	22 °C	30 °C	40 °C	22 °C	30 °C	40 °C
Glucosa	23.51	27.12	31.60	1.963	3.84	4.21	0.66	0.77	1.42	0.63	0.95	1.59
Fructosa	141.51	193.85	229.67	17.367	22.52	36.34	4.43	6.61	13.11	5.97	8.68	14.24
Galactosa	4.09	5.50	8.78	0.426	0.63	1.07	0.10	0.15	0.39	0.12	0.21	0.41
Tagatosa	34.07	53.77	73.58	6.206	8.24	12.02	2.14	2.51	5.42	2.20	3.35	5.34
Lactosa	0.97	1.49	1.87	0.066	0.08	0.12	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03
Lactulosa	19.35	25.37	31.44	1.087	1.31	1.90	0.18	0.29	0.40	0.26	0.37	0.50

Tabla III-2. Solubilidades experimentales (g/L) de las mezclas lactosa/lactulosa y galactosa/tagatosa en los distintos alcoholes a 22, 30 y 40 °C.

	g/l a 22 °C		g/l a 30 °C		g/l a 40 °C	
	Lactulosa	Lactosa	Lactulosa	Lactosa	Lactulosa	Lactosa
Metanol	15.35	0.83	16.85	0.83	23.37	1.15
Etanol	0.85	0.10	1.04	0.12	1.61	0.12
Isopropanol	0.14	0.05	0.22	0.07	0.37	0.08
<i>n</i> -Propanol	0.18	0.03	0.19	0.04	0.44	0.06
	Tagatosa	Galactosa	Tagatosa	Galactosa	Tagatosa	Galactosa
Metanol	36.13	4.05	54.41	5.62	84.00	8.72
Etanol	7.25	0.61	9.93	0.85	17.33	1.81
Isopropanol	2.52	0.15	3.62	0.25	7.01	0.68
<i>n</i> -Propanol	2.70	0.19	4.11	0.34	7.47	0.69

Para poder expresar las solubilidades como fracciones molares (x_s , mol de azúcar/mol de la mezcla), es necesario conocer la densidad de la mezcla. En la Tabla III-3 se muestran los valores de la densidad para algunos sistemas binarios azúcar-alcohol a diferentes temperaturas junto al valor de la solubilidad y la densidad del alcohol puro.

Tabla III-3. Medida de la densidad para algunas mezclas carbohidrato-alcohol a diferentes temperaturas.

azúcar + alcohol	solubilidad (g/L)	T (°C)	densidad mezcla (g/L)	densidad alcohol puro ^a (g/L)	diferencia de densidad ^b (%)
Fructosa + metanol	229.671	40	0.8670	0.774	10.73
Fructosa + metanol	193.849	30	0.8566	0.784	8.48
Tagatosa + metanol	73.582	40	0.8276	0.774	6.48
Tagatosa + metanol	53.774	30	0.8131	0.784	3.58
Glucosa + metanol	31.601	40	0.8161	0.774	5.16
Glucosa + metanol	27.115	30	0.8029	0.784	2.35
Glucosa + etanol	4.214	40	0.7842	0.772	1.56
Galactosa + etanol	1.074	40	0.8015	0.772	3.68
Glucosa + <i>n</i> -propanol	0.945	30	0.7811	0.796	1.91
Galactosa + etanol	0.627	30	0.7889	0.781	1.00

^a Valtz *et al.* (233).

^b $100 \cdot (\text{densidad mezcla} - \text{densidad alcohol puro}) / \text{densidad mezcla}$

Como se observa en la Tabla III-3, cuando la solubilidad del carbohidrato es baja, es razonable considerar que la densidad de la mezcla es igual a la del alcohol puro, siendo la imprecisión introducida en el cálculo de la fracción molar inferior al 5 %. Así, la medida de la densidad de la mezcla se usó para convertir los valores elevados de solubilidad de los carbohidratos en la fracción molar del azúcar, mientras que la densidad del alcohol puro se utilizó para las solubilidades bajas de carbohidratos.

3.1.1.2. Modelado termodinámico de las solubilidades de diferentes carbohidratos en mezclas alcohol-alcohol y alcohol-agua a presión atmosférica

Como se ha mencionado en el apartado 2.2.2.8.1., el modelo A-UNIFAC se seleccionó para representar los datos de solubilidad medidos experimentalmente en este trabajo, junto con información adicional obtenida de la bibliografía (incluyendo la solubilidad de azúcares en diferentes alcoholes y agua). Adicionalmente el modelo A-UNIFAC se empleó para predecir las solubilidades de azúcares en mezclas alcohol-alcohol y alcohol-agua.

3.1.1.3. Cálculo de la solubilidad de carbohidratos en alcoholes puros

Ferreira *et al.* (207) usaron 22 valores experimentales de solubilidad (glucosa, fructosa y sacarosa en metanol y etanol, en un rango de temperaturas entre 25 y 60 °C) para la optimización de los parámetros de interacción entre los grupos de los azúcares y de los alcoholes (CH_3OH y OH). Estos parámetros se emplearon inicialmente para predecir los valores de solubilidad medidos en esta tesis. Aunque los resultados obtenidos no fueron malos, se revisaron varios parámetros de interacción binaria (a_{mm} y a_{nm}), incluyendo los valores experimentales obtenidos en esta tesis (72 valores de solubilidad), junto con los valores de solubilidad que aparecían en la bibliografía (188-192). Los nuevos valores obtenidos aparecen en la Tabla III-4, junto con los valores originales de Ferreira *et al.* (207). El número de grupos hidroxilo asociativos (ν^{OH}) para metanol y etanol es razonable considerarlo 1, pero para isopropanol y *n*-propanol el valor de ν^{OH} debe ser 0.5 para mantener en el grupo hidroxilo (OH) los mismos parámetros de interacción asociativos y de dispersión.

Tabla III-4. Parámetros de los grupos de interacción obtenidos por Ferreira *et al.* (207) y revisados en este trabajo.

a_{mn} (K)	PYR/FUR	-O-	CH ₂	OH	CH ₃ OH	H ₂ O	OH _{ring}
PYR/FUR	0.0	0.0	0.0	50.4 176.5 ^a	-33.8	-154.3	0.0
-O-	0.0	0.0	0.0	0.0 -721.0 ^a	0.0 -323.5 ^a	-508.0	0.0
CH ₂	0.0	0.0	0.0	50.4	122.7	380.5	-60.2
OH	387.4	0.0 -876.6 ^a	387.4	0.0	110.9	-127.3	72.2
CH ₃ OH	-139.7 -197.2 ^a	205.8 -278.7 ^a	-19.78	60.2	0.0	-167.6	31.9
H ₂ O	108.4	155.3	136.8	70.7	251.2	0.0	87.8
OH _{ring}	0.0	0.0	703.4	715.1	681.8	-174.4	0.0

^a Nuevos valores obtenidos para los parámetros revisados en esta tesis.

La Tabla III-5 muestra los valores de desviación media absoluta (average absolute deviations; AAD%) obtenidos teniendo en cuenta los valores experimentales y los valores calculados empleando A-UNIFAC y considerando ambos, los parámetros originales de Ferreira y los nuevos parámetros ajustados en este trabajo. Se puede observar que las desviaciones se reducen considerablemente empleando los nuevos parámetros; sin embargo, se debe considerar que las elevadas desviaciones obtenidas utilizando los parámetros originales de Ferreira se centran en alcoholes y azúcares que no se tuvieron en cuenta para la regresión de los mismos (2). Por ejemplo, utilizando los parámetros originales se obtienen desviaciones alrededor de un 25–30% para glucosa en metanol o etanol mientras que se obtienen errores superiores a un 100% para glucosa en 1-propanol o 2-propanol. Por tanto, cuando se reduce el valor de ν^{OH} para 1-propanol y 2-propanol desde 1 a 0.5, se obtiene una mejor correlación, con valores de AAD% entre 15 y 35% (Tabla III-5). Esto significa que no solo son necesarios valores de ν^{OH} menores que el número real de grupos OH_{ring} presentes en la estructura química del carbohidrato (tal y como sugiere Ferreira *et al.*, 2) sino también que es necesario reducir el valor de ν^{OH} al aumentar el tamaño molecular del alcohol. Esto indica que la fuerza de asociación en mezclas azúcar+alcohol, que se asumía igual a las mezclas alcohol+agua, debe ser menor. Sin embargo, esta conclusión no puede generalizarse considerando sólo la solubilidad de azúcares en metanol, etanol, *n*-propanol, e isopropanol, ya que será necesario disponer de más datos de solubilidad fiables relacionados con alcoholes con mayor longitud de cadena hidrocarbonada.

Tabla III-5. Desviación media absoluta (AAD%) entre las medidas de solubilidad experimentales y los cálculos del modelo A-UNIFAC.

	AAD% calculada	
	Usando los parámetros obtenidos por Ferreira <i>et al.</i> (2007)	Usando los parámetros obtenidos en este apartado
Según el carbohidrato estudiado		
Glucosa	56.2	24.1
Fructosa	33.9	22.9
Galactosa	96.9	33.9
Tagatosa	30.3	15.8
Lactosa	52.6	22.2
Lactulosa	60.6	18.7
Según el alcohol estudiado		
Metanol	53.8	20.1
Etanol	48.9	14.4
<i>n</i> -propanol	63.7	25.7
isopropanol	75.1	36.8

$$AAD\% = 100x \sum \left| (x_s^{\text{exp}} - x_s^{\text{cal}}) / x_s^{\text{exp}} \right|$$

Los valores experimentales y calculados de la solubilidad de azúcares en metanol, etanol, *n*-propanol e isopropanol en función de la temperatura se representan en las Figuras III-3 a III-6.

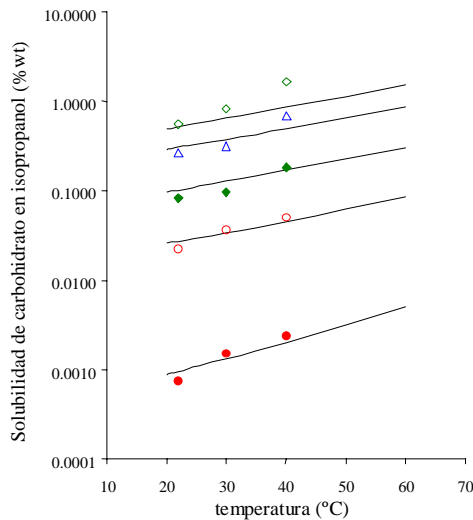


Fig. III-3.- Solubilidad de los carbohidratos en isopropanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (△) tagatosa, (●) lactosa y (○) lactulosa. Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.

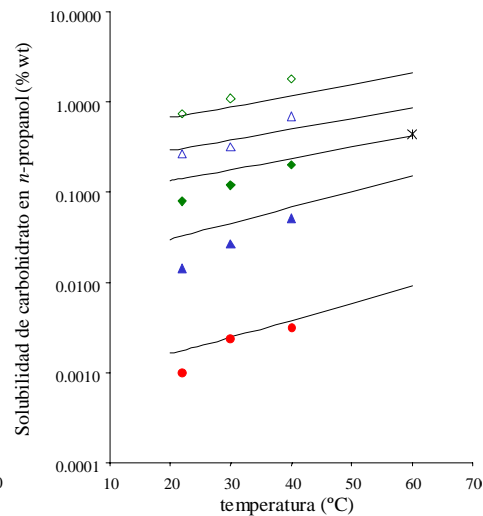


Fig. III-4.- Solubilidad de los carbohidratos en *n*-propanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa y (●) lactosa; referencia (188) (*) glucosa. Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.

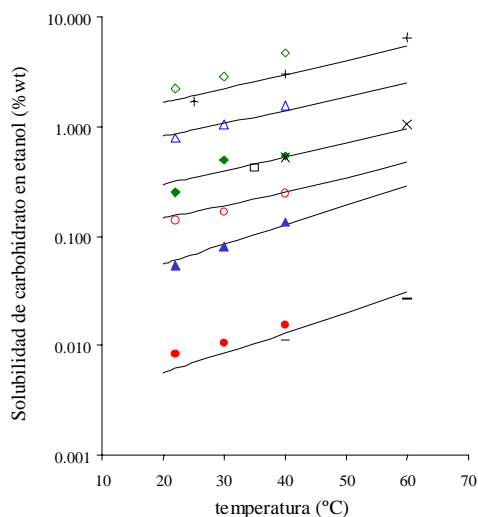


Fig. III-5.- Solubilidad de los carbohidratos en etanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa, (●) lactosa y (○) lactulosa; (+) fructosa (189); (×) glucosa (191); (□) glucosa (195); (-) lactosa (190); Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.

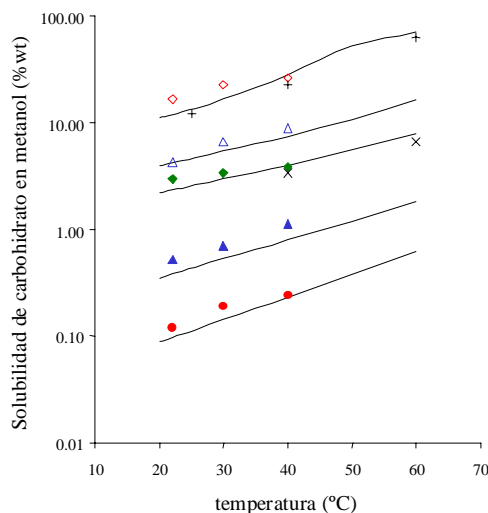


Fig. III-6.- Solubilidad de los carbohidratos en metanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa, y (●) lactosa; (+) fructosa (189); (×) glucosa (191); Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.

Teniendo en cuenta que los valores experimentales de lactulosa y galactosa medidos fueron muy similares empleando metanol, isopropanol y *n*-propanol, se decidió no representar todos los puntos para ambos carbohidratos en todas las figuras para evitar confusiones; de todas formas, en la Figura III-7 se muestra la capacidad global del modelo A-UNIFAC para representar las 72 medidas de solubilidad realizadas en este trabajo, mediante la representación en un gráfico log-log de los valores experimentales *versus* calculados. Como se puede observar considerando las Figuras III-3 a III-7, se obtiene una representación cuantitativa y una diferenciación razonable entre la solubilidad de los diferentes carbohidratos en los cuatro alcoholes estudiados empleando el modelo A-UNIFAC.

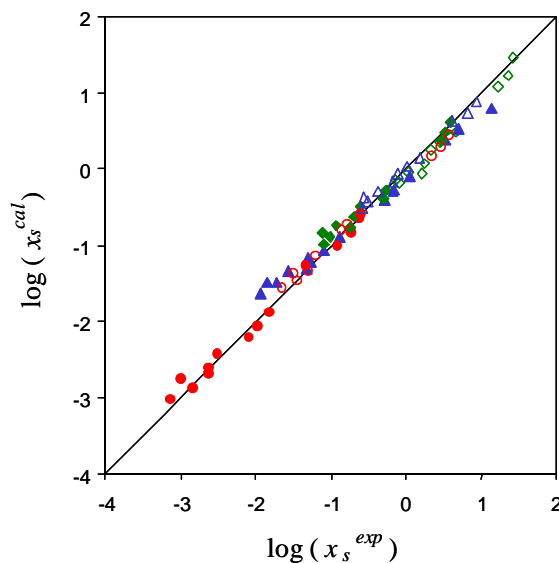


Fig. III-7. Representación logarítmica de los valores de solubilidad de los diferentes carbohidratos calculados *versus* valores experimentales en metanol, etanol, isopropanol y *n*-propanol. Valores experimentales (nuestro estudio): (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa, (●) lactosa y (○) lactulosa.

3.1.1.4. Cálculo de la solubilidad de carbohidratos en agua

La solubilidad de carbohidratos (mono y disacáridos) en agua se predijo usando los parámetros originales de interacción que se presentan en la Tabla III-4. Los valores experimentales empleados por Ferreira *et al.* (2007) para estimar los parámetros entre los grupos del azúcar y el agua (no sólo incluyendo la solubilidad, sino también el punto de congelación y el de ebullición, el coeficiente osmótico, la presión de vapor y los datos de actividad de agua en mezclas glucosa-agua) permiten cálculos muy precisos como se ve en la Figura III-8 para alguno de los carbohidratos estudiados en este trabajo.

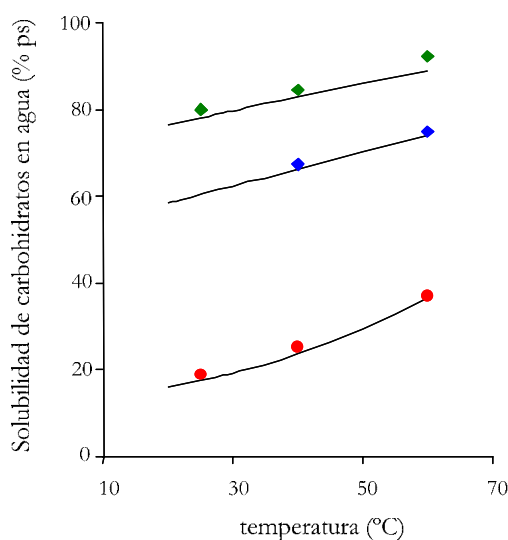


Fig. III-8.- Solubilidad de carbohidratos en agua. Valores experimentales: referencia (191) (◆) glucosa, referencia (189) (◇) fructosa y referencia (190) (●) lactosa. Líneas: cálculos modelo A-UNIFAC.

3.1.1.5. Predicción de la solubilidad de carbohidratos en mezclas ternarias carbohidrato-alcohol-alcohol y carbohidrato-alcohol-agua

Los valores experimentales de solubilidad de mezclas binarias azúcar-alcohol y azúcar-agua se representaron adecuadamente usando el modelo A-UNIFAC y los parámetros de interacción binaria de grupos mostrados en la Tabla III-4. De esta manera, se usó este modelo de manera predictiva para calcular las solubilidades de los carbohidratos en mezclas de disolventes alcohol-agua y alcohol-alcohol. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en la Figura III-9 donde se puede observar que con el modelo A-UNIFAC se obtiene una predicción satisfactoria de la solubilidad de todos los azúcares estudiados.

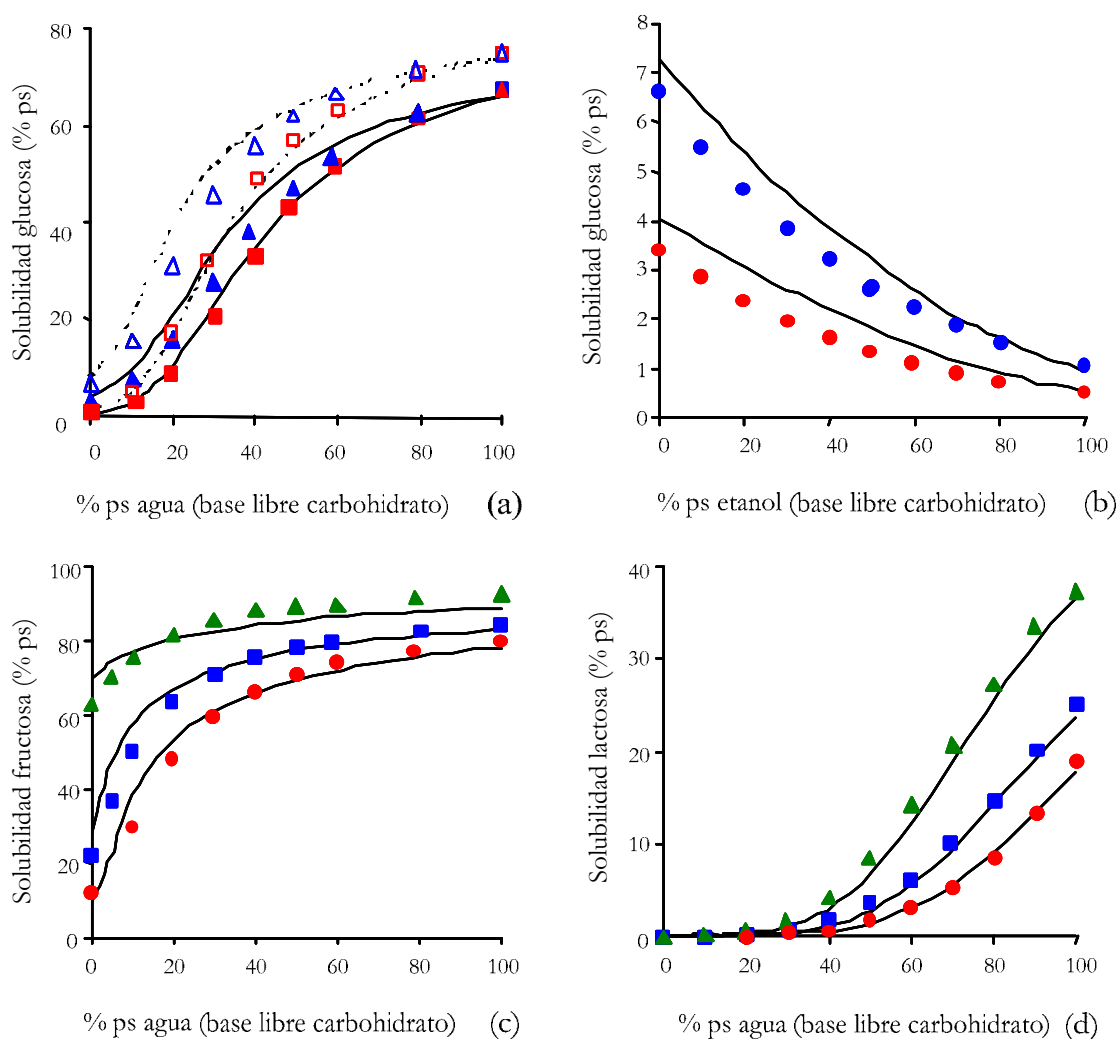


Fig. III-9.-Comparación entre valores experimentales (5-7) de carbohidratos en mezclas alcohol-alcohol y alcohol-agua y predicciones del modelo A-UNIFAC. (a) glucosa-metanol-agua a (\blacktriangle) 40°C y (\triangle) 60°C; glucosa-etanol-agua a (\blacksquare) 40°C y (\square) 60°C. (b) glucosa-metanol-etanol a (\bullet) 40°C y (\circ) 60°C. (c) fructosa-metanol-agua a (\bullet) 25°C (\blacksquare) 40°C y (\blacktriangle) 60°C. (d) lactosa-etanol-agua a (\bullet) 25°C (\blacksquare) 40°C y (\blacktriangle) 60°C.

La Figura III-10 muestra la solubilidad de la fructosa y la glucosa, a la vez que la solubilidad relativa fructosa/glucosa, en mezclas etanol:agua variando el contenido de agua entre el 0 y el 100 % en volumen, calculado según la ecuación 3 y el método de contribución de grupos A-UNIFAC. Como se observa en la figura, la solubilidad de ambos carbohidratos aumenta considerablemente al aumentar la cantidad de agua disuelta en el alcohol. No obstante, la solubilidad relativa entre la cetosa y la aldosa se mantiene casi constante cuando el contenido en agua en el disolvente alcohólico era inferior al 10 % en volumen; para contenidos en agua superiores la solubilidad relativa fructosa/glucosa disminuía considerablemente. De este modo se deduce que el uso de mezclas etanol:agua como modificador, con contenido en agua inferior al 10 % puede aumentar la recuperación de carbohidratos sin afectar la selectividad del proceso para la extracción de la cetosa.

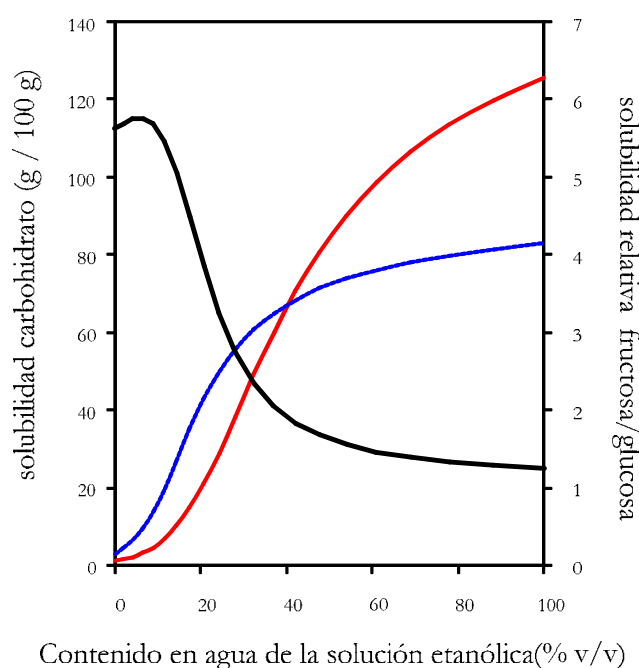


Fig. III-10.- (---) Fructosa, (---) Glucosa y (---) solubilidad relativa Fructosa/Glucosa en mezclas etanol:agua según predicciones del método A-UNIFAC.

3.1.2. Conclusiones

Se han determinado las solubilidades de los carbohidratos glucosa, fructosa, lactosa, lactulosa, galactosa y tagatosa y las mezclas lactosa/lactulosa y galactosa/tagatosa en cuatro alcoholes diferentes (metanol, etanol, *n*-propanol e isopropanol) a 22, 30 y 40 °C. Los resultados presentados en este apartado muestran, por un lado, la mayor solubilidad de las cetosas respecto a sus correspondientes aldosas sin que la solubilidad relativa varíe para contenidos en agua inferiores al 10%, lo que permite abordar con garantías la separación o fraccionamiento selectivo de algunos carbohidratos con propiedades prebióticas. Por otro lado, se demuestra la utilidad del modelo A-UNIFAC para predecir el comportamiento de la solubilidad de los diferentes carbohidratos en diferentes alcoholes e incluso en mezclas

alcohol/alcohol o alcohol/agua. El buen ajuste de los valores experimentales obtenidos asegura la precisión de las predicciones; por lo tanto, el modelo termodinámico propuesto puede usarse para elegir el mejor disolvente para purificar selectivamente un azúcar de una mezcla con diferentes azúcares.

3.2. Medidas de solubilidades de carbohidratos en condiciones supercríticas

Una vez realizado el estudio de las solubilidades de los diferentes carbohidratos en distintos alcoholes a presión atmosférica y considerando las diferencias en solubilidad obtenidas entre cetosas y sus correspondientes aldosas, se llevó a cabo el estudio de las solubilidades de los carbohidratos en condiciones supercríticas (Figura 0-1).

Se estudió la solubilidad en SCCO_2 +modificador de los carbohidratos prebióticos lactulosa y tagatosa, así como de sus correspondientes aldosas, lactosa y galactosa con el objeto de establecer condiciones que permitan su separación de las mezclas originadas en la isomerización de las aldosas durante la síntesis de dichos carbohidratos prebióticos. Por tanto, en este trabajo se midieron las solubilidades en medio supercrítico de lactosa, lactulosa, galactosa y tagatosa empleando presiones de 100, 200 y 300 bar y temperaturas de 60 y 100 °C. El modificador elegido fue una mezcla etanol/agua 95/5 (v/v) y se utilizaron flujos de 0.2, 0.4 y 0.6 mL/min. Hasta estos momentos, no existían en la bibliografía datos de solubilidad de carbohidratos en medio supercrítico, únicamente algunos datos correspondientes a glucosa y fructosa en SCCO_2 puro a tres temperaturas diferentes (35, 55 y 75 °C) y presiones de 200 bar (242).

Además, los resultados experimentales se ajustaron a un modelo termodinámico empleando la ecuación cúbica de estado de Soave-Redlich-Kwong y las reglas de mezclado modificadas de segundo orden de Huron-Vidal (MHV2), que emplean el mS-UNIFAC, el cual introduce nuevos grupos en el UNIFAC original para representar las moléculas de carbohidratos.

El plan de trabajo desarrollado para la consecución de este objetivo se muestra en la Figura III-11:

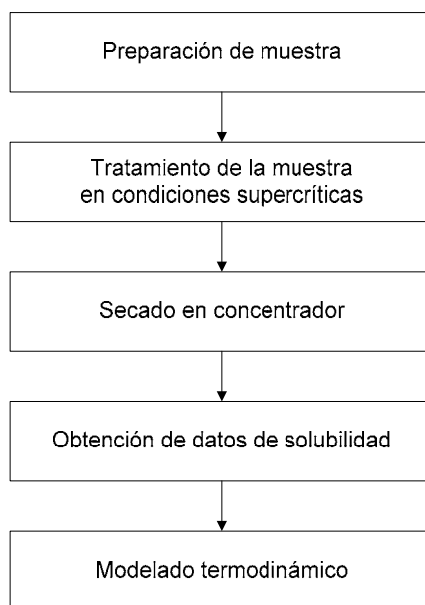


Fig. III-11.-Esquema de trabajo empleado para la medida de solubilidades supercríticas

3.2.1. Resultados y discusión

3.2.1.1. Solubilidades de los distintos carbohidratos en condiciones supercríticas. *Experimental.*

Considerando como punto de partida los resultados obtenidos en el apartado 3.1., en el que se demostró la mayor solubilidad de las cetosas respecto a sus correspondiente aldosas en alcoholes y mezclas alcohol-agua, se llevó a cabo el estudio de solubilidad en condiciones supercríticas. El objetivo final de este estudio consistió en obtener datos experimentales que permitieran el desarrollo de un proceso para la purificación selectiva de carbohidratos prebióticos, lactulosa y tagatosa, de mezclas binarias con lactosa y galactosa, respectivamente.

Para ello, se llevaron a cabo ensayos de solubilidad para todos los carbohidratos objeto de estudio (lactulosa, lactosa, tagatosa y galactosa) usando etanol/agua 95:5 v/v como modificador. Los experimentos se diseñaron teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos para la solubilidad de carbohidratos a presión atmosférica. Debido al limitado número de datos disponibles en la bibliografía en relación a la solubilidad de estos carbohidratos en condiciones supercríticas se eligió un amplio intervalo de presiones y temperaturas: presiones de extracción 100, 200 y 300 bar, temperaturas de extracción de 60 y 100 °C y flujos de modificador de 0.2, 0.4 y 0.6 mL/min. De esta manera se realizaron los experimentos considerando doce combinaciones de P-T-F.

Las valores experimentales de solubilidad obtenidos para los diferentes carbohidratos a las diferentes condiciones de extracción se muestran en la Tabla III-6, y se expresan

como miligramo de carbohidrato por gramo de disolvente (CO_2 + etanol 95:5 v/v). Los coeficientes de regresión obtenidos en los cálculos de solubilidad fueron superiores al 92% (esto indica que la incertidumbre fue para todos los casos inferior al 8%). En la Tabla III-7 también se muestra la solubilidad relativa cetosa/aldosa, calculada como la relación entre la solubilidad de la cetosa (lactulosa o tagatosa) y la solubilidad de la aldosa (lactosa o galactosa).

Tabla III-6. Solubilidad de la lactulosa, lactosa, tagatosa y galactosa en SCCO_2 con etanol/agua (95:5 v/v) como modificador.

T (°C)	P (bar)	Solubilidad del carbohidrato (mg /g disolvente)			
		Lactulosa (Lu)	Lactosa (La)	Tagatosa (Ta)	Galactosa (Ga)
0.2 mL/min modificador (6 ps% modificador)					
60	100	0.2508	0.0296	0.5536	0.0495
60	200	0.0465	0.0215	0.4499	0.0313
60	300	0.1311	0.0379	0.5312	0.0385
100	100	0.4058	0.0382	0.4977	0.1032
100	200	0.0487	0.0149	0.4401	0.0231
100	300	0.1984	0.0200	0.6295	0.0959
0.4 mL/min modificador (14 ps% modificador)					
60	100	0.1224	0.0592	0.5655	0.1103
60	200	0.0488	0.0559	0.5296	0.0984
60	300	0.1045	0.0979	0.6988	0.0992
100	100	0.1622	0.1084	0.9824	0.2442
100	200	0.0805	0.0713	0.8887	0.0932
100	300	0.3678	0.1399	1.0887	0.1692
0.6 mL/min modificador (21 ps% modificador)					
60	100	0.1017	0.5682	0.6589	0.1946
60	200	0.0345	0.3968	0.6299	0.0527
60	300	0.4799	0.6273	0.7804	0.1130
100	100	0.2249	0.2359	1.0073	0.2966
100	200	0.0877	0.1505	0.9584	0.1167
100	300	0.2301	0.1581	1.3747	0.2883

Para comprobar que se había alcanzado la solubilidad máxima, se llevaron a cabo varios experimentos preliminares (N_{exp}). Para cada carbohidrato empleado, se determinaron unas condiciones de extracción (presión, temperatura y flujo de modificador) y se examinaron diferentes flujos para el modificador (etanol/agua 95:5 v/v). Para todos los casos se obtuvo una pendiente (lineal) similar cuando se representó la cantidad de carbohidrato extraída *versus* la cantidad de fluido supercrítico empleado. Por tanto, la disolución del carbohidrato en el disolvente se controló logrando que se alcanzaran las condiciones de equilibrio y solubilidad. La diferencia absoluta en las correspondientes pendientes (valores de solubilidad) fue menor de 0.0029 mg/g en todos los casos. La media absoluta de las desviaciones relativas ($AARD = (1/N_{\text{exp}}) \sum |(s_{c,i} - \bar{s}_c) / \bar{s}_c|$) entre la solubilidad medida en los experimentos ($s_{c,i}$) y la media obtenida (\bar{s}_c) fue inferior al 1%.

Adicionalmente, la Tabla III-7 muestra los valores de solubilidad expresados como fracción molar del carbohidrato en la fase supercrítica. Para obtener la fracción molar de

los diferentes carbohidratos a partir de los datos de la Tabla III-6, se aplicó la siguiente ecuación:

$$y_c = \frac{s_c \cdot 10^{-3} / MW_c}{(1 - x_m) / MW_{CO_2} + x_m \cdot 0.938 / MW_{etanol} + x_m \cdot 0.062 / MW_{H_2O}} \quad (\text{Ecuación III-1})$$

donde y_c es la fracción molar del carbohidrato, s_c es la solubilidad del carbohidrato que aparece en la Tabla III-6, x_m es la fracción másica del modificador (6, 14 o 21 % ps de etanol/agua 95:5 v/v) en el disolvente supercrítico y MW_c , MW_{CO_2} , MW_{etanol} y MW_{H_2O} son, respectivamente, los pesos moleculares de los carbohidratos, CO_2 , etanol y agua. Hay que remarcar que en la ecuación III-1 se ha asumido que una mezcla etanol/agua 95:5 v/v contiene 93.8% ps de etanol.

Tabla III-7. Solubilidad (fracción molar) de la lactulosa, lactosa, tagatosa y galactosa en $SCCO_2$ con 6, 14 y 21% peso de modificador (etanol:agua 95:5 v/v).

T (°C)	P (bar)	Y_c : solubilidad del carbohidrato (fracción molar $\times 10^5$)				Solubilidad relativa	
		Lactulosa (Lu)	Lactosa (La)	Tagatosa (Ta)	Galactosa (Ga)	Lu/La	Ta/Ga
0.2 mL/min modificador (6 ps% modificador)							
60	100	3.2173	2.0935	14.8093	1.3242	1.54	11.18
60	200	0.5965	1.7048	12.0353	0.8373	0.35	14.37
60	300	1.6817	0.3104	14.2101	1.0299	5.42	13.80
100	100	5.2056	0.4926	13.3140	2.7607	10.57	4.82
100	200	0.6247	0.5798	11.7731	0.6179	1.08	19.05
100	300	2.5451	0.2976	16.8397	2.5654	8.55	6.56
0.4 mL/min modificador (14 ps% modificador)							
60	100	1.5641	0.6070	15.0691	2.9392	2.58	5.13
60	200	0.6236	1.1871	14.1124	2.6221	0.53	5.38
60	300	1.3353	0.7846	18.6211	2.6434	1.70	7.04
100	100	2.0726	1.3852	26.1783	6.5073	1.50	4.02
100	200	1.0286	0.9111	23.6815	2.4835	1.13	9.54
100	300	4.6998	1.7877	2.9011	4.5087	2.63	0.64
0.6 mL/min modificador (21 ps% modificador)							
60	100	1.2952	7.2361	17.4986	5.1680	0.18	3.39
60	200	0.4394	5.0533	16.7284	1.3996	0.09	11.95
60	300	6.1116	7.9887	20.7253	3.0010	0.77	6.91
100	100	2.8641	3.0042	26.7511	7.8769	0.95	3.40
100	200	1.1169	1.9166	25.4525	3.0992	0.58	8.21
100	300	2.9303	2.0134	36.5083	7.6565	1.46	4.77

Las Figuras III-12 a III-19 representan, respectivamente, la solubilidad (fracción molar) de la lactosa, lactulosa, tagatosa y galactosa. Como se puede observar, las isotermas de la solubilidad para cada carbohidrato presentan mínimos con la presión en el rango

estudiado. Este comportamiento ya fue observado por Yau y Tsai (242) en su datos de solubilidad para glucosa y fructosa en condiciones subcríticas y supercríticas.

La mayor solubilidad relativa entre lactulosa y lactosa se obtuvo a 100 bar y 100 °C y usando la cantidad más baja de modificador (etanol/agua 95:5 v/v) disuelto en CO₂, indicando que se puede conseguir, en estas condiciones, una recuperación selectiva de lactulosa (carbohidrato prebiótico) de una mezcla cetosa/aldosa.

Por otro lado, la solubilidad relativa entre la tagatosa y la galactosa es considerablemente mayor en todas las condiciones estudiadas. Por lo tanto, el aumento observado de la solubilidad de la tagatosa con el flujo del modificador sugiere que su rendimiento durante la extracción puede incrementarse sustancialmente al aumentar la cantidad de modificador disuelto en CO₂ sin perder su selectividad.

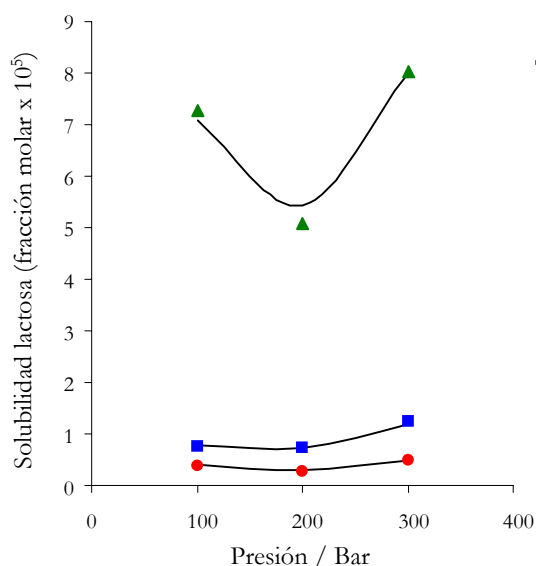


Fig. III-12.-Solubilidad de la lactosa en SCCO₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

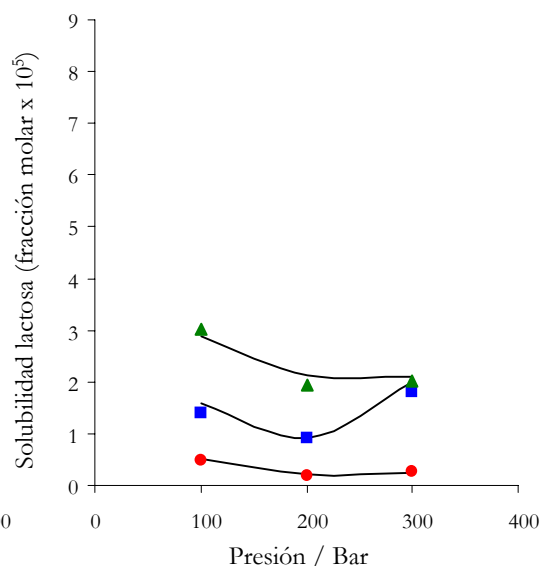


Fig. III-13.-Solubilidad de la lactosa en SCCO₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

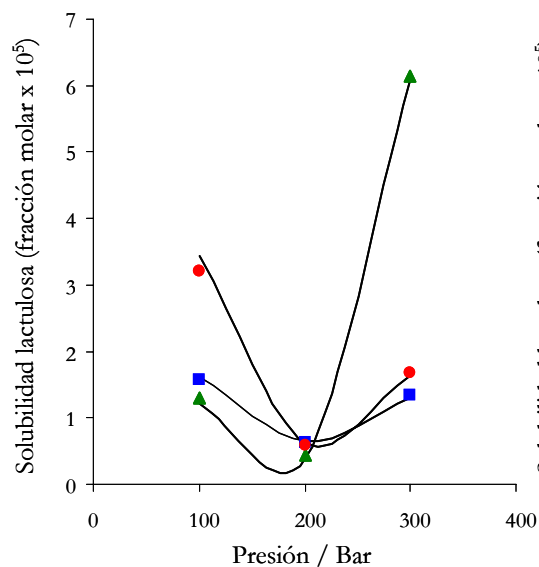


Fig. III-14.-Solubilidad de la lactulosa en SCCO_2 + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

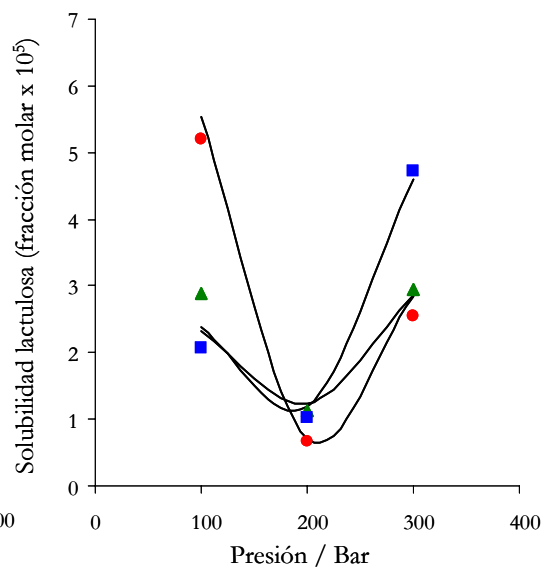


Fig. III-15.-Solubilidad de la lactulosa en SCCO_2 + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

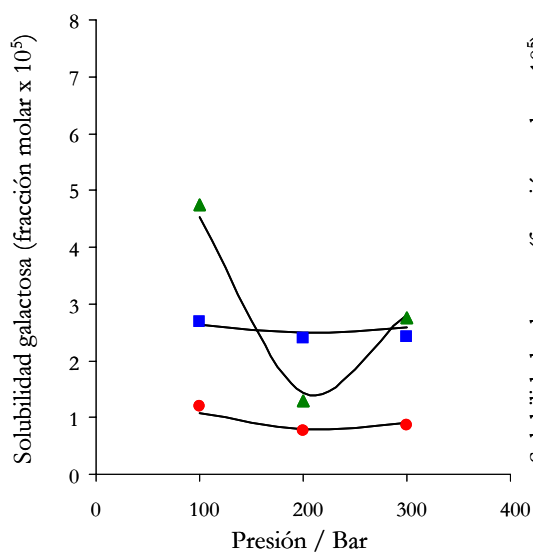


Fig. III-16.-Solubilidad de la galactosa en SCCO_2 + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

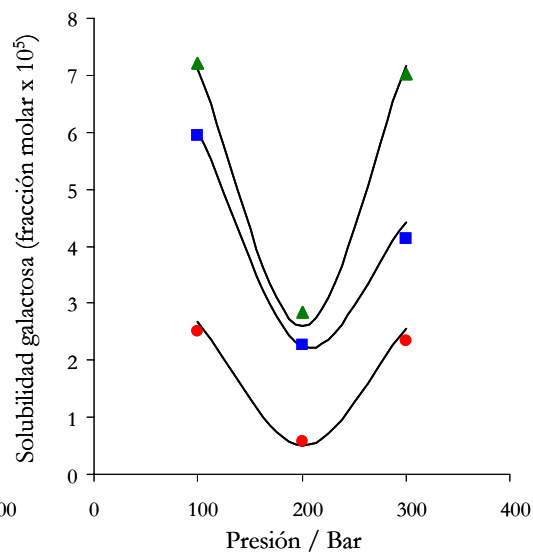


Fig. III-17.-Solubilidad de la galactosa en SCCO_2 + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

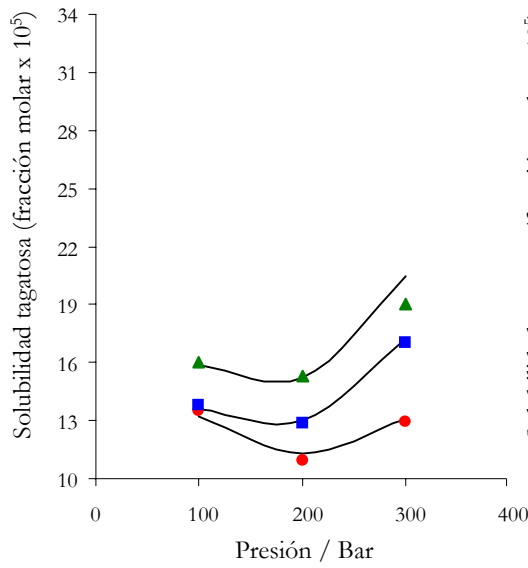


Fig. III-18.-Solubilidad de la tagatosa en SCCO₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

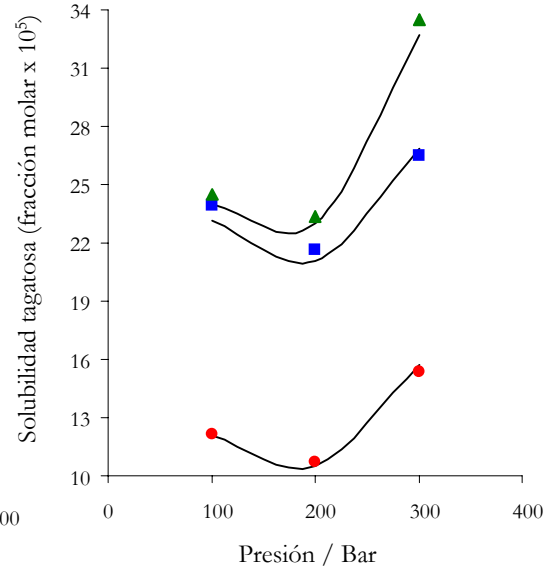


Fig. III-19.-Solubilidad de la tagatosa en SCCO₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.

3.2.1.2. Solubilidades en condiciones supercríticas. Modelado termodinámico empleando la EdE de Soave-Redlich-Kwong con las reglas modificadas de segundo orden de Huron-Vidal (SRK-MHV2)

Para llevar a cabo el estudio del modelado de las solubilidades de los carbohidratos en condiciones supercríticas, se selecciona la ecuación cúbica de estado (CEdE) de Soave-Redlich-Kwong (SRK) con las reglas de mezclado modificadas de segundo orden de Huron-Vidal (MHV2) (239) (ver apartado 6.2 para una descripción del marco teórico).

En este trabajo se incorpora el mS-UNIFAC de Tsavas *et al.* (240), una extensión del modelo de energía de exceso de Gibbs de Larssen *et al.* (241), a presión cero en el término atractivo a del CEdE de SRK:

$$q_1 \left(\alpha - \sum_{i=1}^{N_c} z_i \alpha_{ii} \right) + q_2 \left(\alpha^2 - \sum_{i=1}^{N_c} z_i \alpha_{ii}^2 \right) = \frac{g_{(P=0)}^E}{RT} + \sum_{i=1}^{N_c} z_i \ln \left(\frac{b}{b_{ii}} \right) \quad (\text{Ecuación III-2})$$

En esta ecuación, z_i es la composición de la fase supercrítica en fracción molar y los parámetros adimensionales α y α_{ii} están relacionados con los parámetros de la mezcla y el componente puro como sigue:

$$\alpha = \frac{a_{mix}}{b_{mix}RT} \text{ y } \alpha_{ii} = \frac{a_{ii}}{b_{ii}RT} \quad (\text{Ecuación III-3})$$

Los valores recomendados para q_1 y q_2 son, respectivamente, -0.478 y -0.0047.

El mS-UNIFAC (240) permite el modelado de la fase de equilibrio de mezclas de carbohidratos y derivados de carbohidratos tanto en agua como en otros disolventes introduciendo dos nuevos grupos principales UNIFAC, a saber el grupo CHOH de los carbohidratos y el grupo osídico CH-O-CH.

3.2.1.2.1. Estimación de propiedades de los componentes puros

Para calcular la fugacidad de un soluto sólido puro y de acuerdo con la ecuación III-2, se necesitan los siguientes valores: sus propiedades de fusión (entalpía ΔH_m y temperatura T_m de fusión) y la presión de sublimación (P_{subl}^*) y sus parámetros críticos (T_c y P_c).

Las temperaturas de fusión de todos los carbohidratos estudiados han sido ya medidas experimentalmente (14-16); para la lactosa (243) y galactosa (244) también se conocen los valores de sus entalpías de fusión.

Para las demás propiedades que se desconocen y se necesitan y no están disponibles en la bibliografía, se empleó un algoritmo (245) para estimarlas.

La entalpía de fusión se estimó aplicando el método de Jain (232). Las presiones de sublimación a las temperaturas de interés se calcularon a partir de la ecuación de Clapeyron, aplicando los valores para las propiedades de fusión de los carbohidratos; el volumen sólido se estimó aplicando el método propuesto por Goodman *et al.* (246); los parámetros críticos se estimaron aplicando los métodos recomendados por Cholakov *et al.* (247) y Wakeham *et al.* (248). Todas las propiedades de los componentes puros necesarias y cómo han sido obtenidas están reflejadas en la Tabla III-8. Finalmente, la fugacidad del soluto puro en la fase líquida subenfriada, la presión del punto triple y el V^{SCL} se calcularon a partir de la EdE.

Tabla III-8. Propiedades de los carbohidratos puros estudiados.

	T_m	ΔH_m	T_c^a	P_c^a	V^{Sb}	$P_{\text{subl}}^* / \text{bar}$		Referencia	Referencia
	/ °C	/J·mol ⁻¹	/ °C	/ bar	/cm ³ ·mol ⁻¹	60 °C	100 °C	para la estimación T_m	para la estimación ΔH_m
Lactosa	223	75240	848.6	210.6	346.96	5.82·10 ⁻¹⁵	5.38·10 ⁻¹²	(244)	(243)
Lactulosa	169	57506	788.8	224.5	347.16	1.73·10 ⁻¹³	1.28·10 ⁻¹⁰	(244)	(232)
Galactosa	163	43778	492.3	265.3	212.06	9.57·10 ⁻⁷	4.72·10 ⁻⁵	(249)	(244)
Tagatosa	134	34454	480.8	271.4	186.48	4.42·10 ⁻⁶	1.58·10 ⁻⁴	(84)	(232)

^a Estimados aplicando los métodos recomendados por Cholakov *et al.* (247) y Wakeham *et al.* (248).

^b Estimado por el método propuesto por Goodman *et al.* (246).

3.2.1.3. Modelado termodinámico

En nuestro estudio, los valores de los parámetros de interacción entre los dos nuevos grupos funcionales (CHOH y CH-O-CH) y los grupos del modelo UNIFAC son los propuestos en (240). Asimismo, los parámetros entre los grupos UNIFAC son los propuestos por Larsen *et al.* (241). Los correspondientes parámetros de interacción entre el CO₂ y los grupos UNIFAC son los propuestos en (250) y entre el CO₂ y los dos nuevos grupos funcionales fueron ajustados utilizando los valores experimentales de solubilidad obtenidos en este estudio. Los valores obtenidos son los siguientes: $a_{\text{CHOH}-\text{CO}_2} = -256.82$; $a_{\text{CO}_2-\text{CHOH}} = (409.32; -2.87)$; $a_{\text{CHOCH}-\text{CO}_2} = 2500$; $a_{\text{CO}_2-\text{CHOCH}} = (329.5; -7.43)$.

La concordancia entre los valores de las solubilidades medidas experimentalmente y los calculados aplicando la EdE SRK con las reglas de mezclado MHV2 como modelo termodinámico es bueno para los cuatro carbohidratos estudiados (ver Tabla III-8), lo cual puede atribuirse al hecho de que el esqueleto cíclico de las moléculas de los carbohidratos están muy bien representadas con los dos nuevos grupos principales UNIFAC para los carbohidratos. Se debe remarcar, sin embargo, que los parámetros de interacción entre el CO₂ y los dos nuevos grupos para carbohidratos representan sólo una elección entre otras posibles, debido a lo limitado de los datos experimentales disponibles, y son válidos para estos datos particulares.

La desviación media (AAPE) y máxima (MAPE) para los valores de solubilidad experimentales, y_i^{exp} , y los calculados por el modelo, y_i^{calc} se muestran en la Tabla III-9 y se han calculado de la siguiente manera:

$$AAPE = \left(\frac{1}{N} \right) \left(\sum_{j=1}^N \frac{|y_i^{\text{exp}} - y_i^{\text{calc}}|}{y_i^{\text{exp}}} \right) \quad (\text{Ecuación III-4})$$

$$MAPE = \left| \frac{y_i^{\text{exp}} - y_i^{\text{calc}}}{y_i^{\text{exp}}} \right|_{\text{max}} \quad (\text{Ecuación III-5})$$

Tabla III-9. La desviación media (AAPE) y máxima (MAPE) entre los valores de solubilidad experimentales y los calculados por el modelo para los carbohidratos estudiados en este capítulo.

Carbohidrato	AAPE/%	MAPE/%
Lactosa	6.19	14.70
Lactulosa	7.39	19.87
Galactosa	5.43	12.34
Tagatosa	2.07	7.82

Donde N es el número de valores. Como puede verse, las desviaciones para los disacáridos son mayores que para los monosacáridos, lo que es razonable teniendo en cuenta la estructura más compleja de los disacáridos, incluyendo dos estructuras de piranosa para la lactosa y una de furanosa para la lactulosa.

3.2.2. Conclusiones

Se ha estudiado la solubilidad de los cuatro carbohidratos en SCCO_2 con etanol/agua 95:5 (v/v) como modificador a dos temperaturas $T=60$ y $100\text{ }^\circ\text{C}$, rango de presiones entre 100 y 300 bar y cantidades de modificador entre 6 y 21 ps%. Las solubilidades medidas están en el rango 0.02-1.09 miligramos de carbohidrato/ gramo de disolvente. Para todos los carbohidratos estudiados, la solubilidad a temperatura constante presenta un mínimo a 200 bar en el rango de presiones estudiado (100-300 bar).

Por lo que respecta a la solubilidad supercrítica relativa cetosa/aldosa, los valores son mayores que uno para la mayoría de las condiciones experimentales estudiadas.

La solubilidad relativa entre la lactulosa y la lactosa cambia desde valores mayores a 1 cuando se emplea un 6 ps% de modificador, a valores inferiores a 1 cuando se utiliza un 21 ps% de modificador. Por lo tanto, pequeñas cantidades de modificador favorecerán la extracción selectiva de lactulosa en mezclas lactulosa/lactosa. Por otro lado, la solubilidad relativa entre la tagatosa y la galactosa es mayor que 1 para todas las cantidades de modificador empleadas en este trabajo. Por lo tanto, un incremento en la cantidad de modificador en el proceso de extracción supercrítica aumentará la extracción de tagatosa manteniendo una buena selectividad.

A las temperaturas ensayadas y en el rango de presiones 100-300 bar, las solubilidades de los carbohidratos en SCCO_2 puro (257) y en SCCO_2 + etanol:agua como modificador (40) presentan mínimos a 200 bar. Las solubilidades obtenidas en este apartado, en general, aumentaron con la temperatura y para las mayores cantidades de modificador disueltas en el CO_2 . Ciertamente, la cantidad de modificador que podía ser disuelta homogéneamente en el CO_2 dependía de la presión y la temperatura.

El modelo termodinámico empleado es capaz de proporcionar una buena correlación para los valores de solubilidad, debido a una adecuada representación de la fugacidad de los solutos sólidos.

3.3. Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para mezclas lactulosa/lactosa y tagatosa/galactosa

Una vez demostrado que existen importantes diferencias de solubilidad entre las cetosas y sus respectivas aldosas, el siguiente paso consistió en el fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. En este capítulo se presentan los resultados más relevantes del fraccionamiento de mezclas lactulosa/lactosa y tagatosa/galactosa en medio supercrítico.

Por tanto, el objetivo de este capítulo es la optimización de las condiciones de extracción y fraccionamiento supercrítico de lactulosa y tagatosa de sus respectivas mezclas con lactosa y tagatosa según el esquema de la Figura III-20.

Para llevar a cabo este estudio se planteó utilizar técnicas de diseño experimental que suponen una serie de ventajas respecto a la optimización por etapas. En este sentido, el empleo de diseños experimentales permite obtener información sobre el proceso, y sobre las variables que más influyen y sus interacciones, con un moderado número de experimentos. Asimismo, ofrecen la posibilidad de obtener un modelo tecnológico que permita describir el comportamiento del proceso dentro del intervalo experimental estudiado.

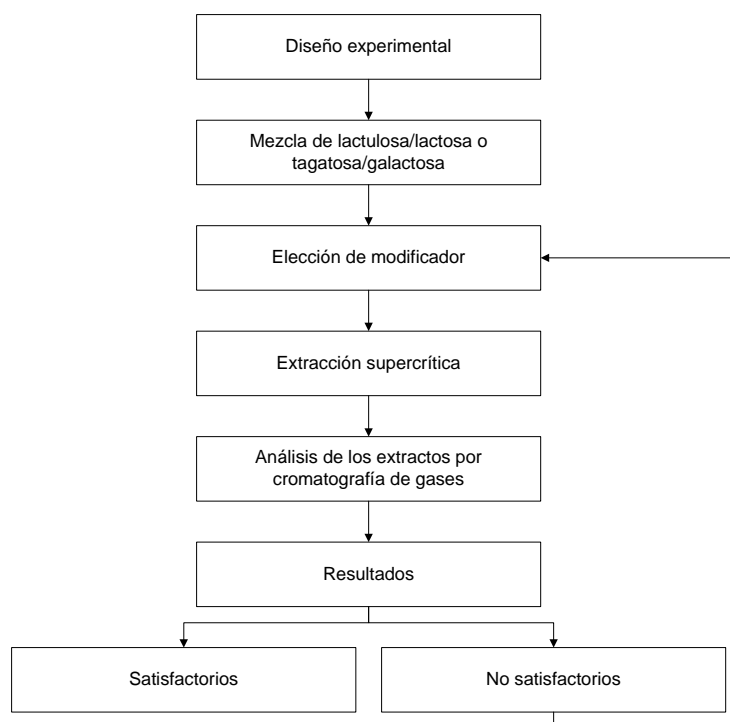


Fig. III-20. Esquema de trabajo empleado para el fraccionamiento supercrítico de la mezclas de carbohidratos

Se ensayaron diferentes condiciones de extracción con CO₂ supercrítico empleando un amplio intervalo de condiciones experimentales (presión de extracción: 100 a 300 bar; temperatura de extracción: 60 a 100 °C, y flujo de modificador: 0.2 a 0.7 mL/min). Los intervalos considerados abarcan la región supercrítica adicionando un modificador polar al CO₂ empleado en la extracción; a tal efecto se estudió la adición de diferentes alcoholes y mezclas etanol/agua. La mezcla que se colocó en la celda tenía una relación porcentual 70/30 (70 cetosa/30 aldosa), por ser ésta próxima a la obtenida mediante las reacciones de isomerización en las que se obtienen la lactulosa y la tagatosa. Por tanto, se consideró que alrededor del 70% era lactulosa o tagatosa mientras que el 30% restante estaba formado por diferentes carbohidratos entre los que destacaba, la aldosa sin reaccionar. Se asumió que el 30 % no isomerizado era lactosa y galactosa, respectivamente para cada mezcla.

Finalmente se hizo un seguimiento del proceso mediante análisis de las muestras y fracciones obtenidas utilizando métodos ya establecidos en nuestro laboratorio basados en la separación por cromatografía de gases de los trimetilsilil derivados.

3.3.1. Resultados y discusión

3.3.1.1. Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para mezclas lactulosa/lactosa

Una vez determinadas las solubilidades de los distintos carbohidratos en condiciones supercríticas y con el objetivo de estudiar más en profundidad las posibles interacciones entre los distintos factores que intervienen en el proceso de extracción supercrítica, es decir, presión, temperatura y flujo de modificador y su efecto sobre la selectividad y el rendimiento del proceso, se llevó a cabo un diseño experimental tomando como punto de partida los resultados anteriormente descritos.

3.3.1.1.1. Selección de la composición del modificador

Dado que la naturaleza del modificador influye en la recuperación selectiva de lactulosa de mezclas con lactosa (tal y como se demuestra en los apartados 3.1 y 3.2 de resultados y discusión), se realizaron ensayos usando diferentes relaciones de etanol/agua como modificador durante la extracción con SCCO₂. Aunque las medidas de solubilidad permitieron seleccionar como modificador de la polaridad la mezcla etanol/agua, en este estudio se llevó a cabo un estudio de distintas relaciones etanol/agua (3 relaciones diferentes) y se observó su efecto en la selectividad y el rendimiento de la extracción. Previamente se realizaron varios experimentos empleando únicamente CO₂ supercrítico (puro), que no dieron lugar a ningún extracto, confirmándose de este modo los datos que aparecen en la bibliografía (150, 251).

Las condiciones supercríticas elegidas para llevar a cabo los experimentos para la selección del modificador más adecuado fueron 100 bar de presión, 100 °C de temperatura y 0.2 mL/min de flujo del modificador; estas condiciones se eligieron considerando los resultados experimentales mostrados en el apartado 3.2. Se observó que la pureza con la que se obtenía la lactulosa dependía, como se ha comentado anteriormente, de la composición del modificador y, más concretamente, de su relación etanol/agua. La Tabla III-10 muestra la pureza obtenida (valor medio) con las diferentes relaciones etanol/agua empleadas (90:10, 92.5:7.5 y 95:5), siendo las diferencias entre ellas estadísticamente significativas para $p < 0.05$ ($n=2$). Usando la mezcla etanol/agua 95:5, se obtiene una lactulosa de pureza 95.6 %, y ésta va disminuyendo a medida que aumenta la cantidad de agua en la mezcla. En la Figura III-21 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada uno de los experimentos.

Asimismo, en estos experimentos se analizó el CO₂ despresurizado para ver si arrastraba algo de muestra y se comprobó que no era así. De igual modo se analizó el residuo de cada experimento en la celda para verificar la validez del método de análisis empleado.

Tabla III-10. Experimentos para seleccionar la composición del modificador de la fase supercrítica.

Experimento	Relación etanol/agua	% lactulosa en el extracto
1	90:10	74.1
2	92.5:7.5	78.8
3	95:5	95.6

Por tanto, y corroborando los resultados obtenidos anteriormente sobre las medidas de solubilidad en medio supercrítico, se eligió como modificador el etanol con un 5 % de agua para llevar a cabo el diseño experimental para la extracción selectiva de lactulosa de sus mezclas con lactosa.

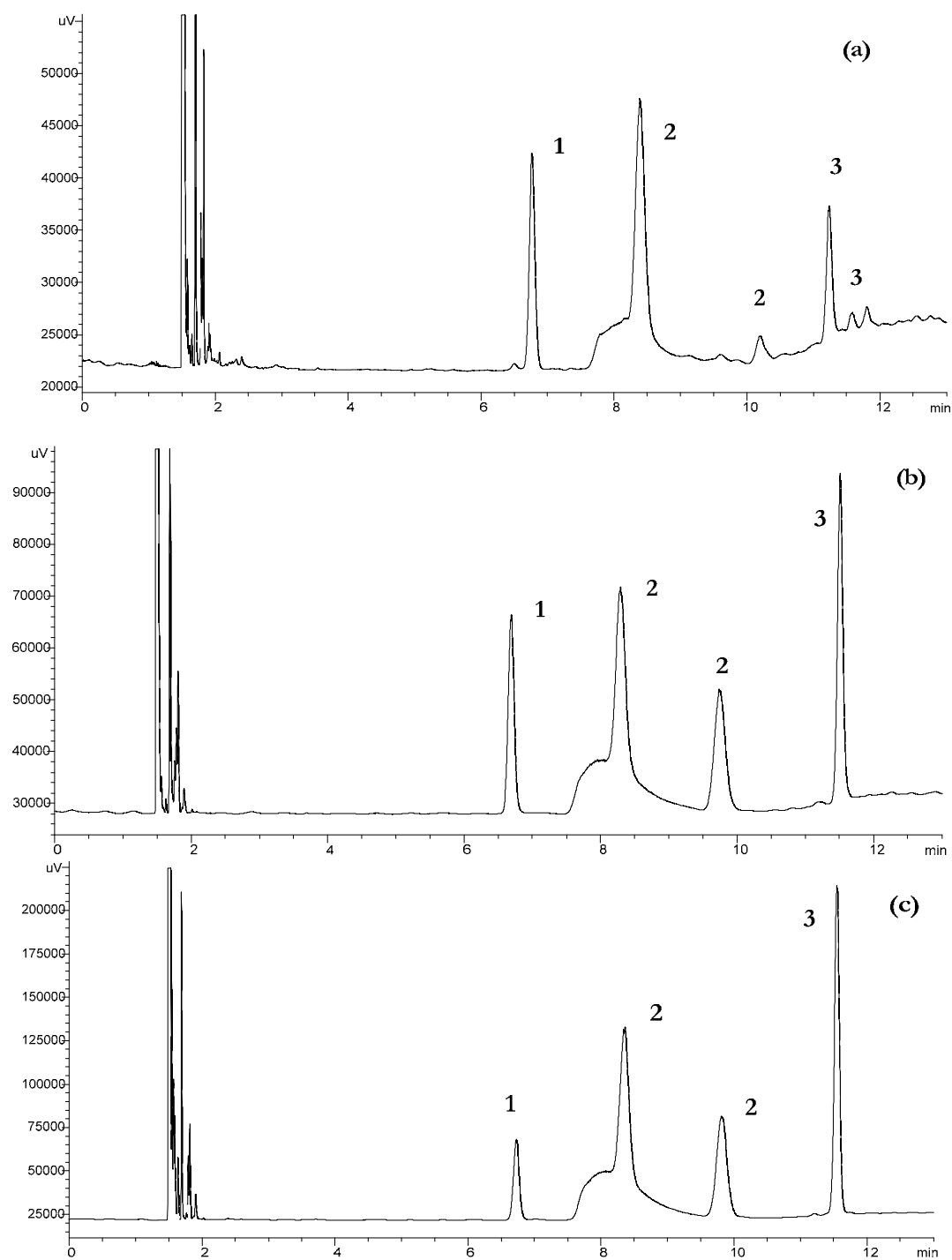


Fig. III-21.-Extracciones supercríticas de mezclas lactulosa-lactosa 70/30 (% en peso) para 300 bar/60 °C/0.2 mLmin⁻¹ flujo de modificador. **1.** Patrón interno (β -fenil-glucósido); **2.** Lactulosa; **3.** Lactosa. **(a)** modificador etanol/agua 95/5 (v/v); **(b)** modificador etanol/agua 92.5/7.5 (v/v); **(c)** modificador etanol/agua 90/10 (v/v).

3.3.1.1.2. Efecto de los factores

En la Tabla III-11 se muestran los resultados de la matriz del diseño experimental mientras que en la Figura III-22 se representan los cromatogramas de los experimentos 1, 3, 6 y 7, por ser los más representativos en cuanto a recuperación de lactulosa. Los

experimentos 9 al 11 corresponden a los ensayos realizados a cabo por triplicado (punto central), y cuya desviación estándar fue 0.63 mg para la lactulosa y 0.05 mg para la lactosa.

Tabla III-11. Resultados obtenidos para la matriz del diseño experimental (cantidad total extraída, composición porcentual de Lu en el extracto, composición porcentual de La en el extracto y recuperación de Lu y La respecto a las cantidades iniciales de cada carbohidrato).

Exp. No.	Factores			Variables de respuesta				
	P (bar)	T (°C)	M (mL/min)	Cantidad extraída (mg)	% Lu extracto	% La extracto	Recuperación Lu (%)	Recuperación La (%)
1	100	60	0.2	0.28	96.43	3.57	0.39	0.03
2	300	60	0.2	0.69	98.55	1.45	0.97	0.05
3	100	100	0.2	33.39	95.63	4.37	45.61	4.86
4	300	100	0.2	0.62	96.77	3.23	0.85	0.07
5 ^a	100	60	0.4	-	-	-	-	-
6	300	60	0.4	5.25	98.10	1.90	7.36	0.34
7	100	100	0.4	13.71	94.60	5.40	18.53	2.48
8	300	100	0.4	7.34	96.46	3.54	10.11	0.86
9	200	80	0.3	4.81	97.30	2.70	6.68	0.45
10	200	80	0.3	5.46	96.52	3.48	7.53	0.64
11	200	80	0.3	4.09	97.80	2.20	5.71	0.30

^a Experimento realizado en dos fases (líquido vapor) que no fue considerado en el análisis estadístico.

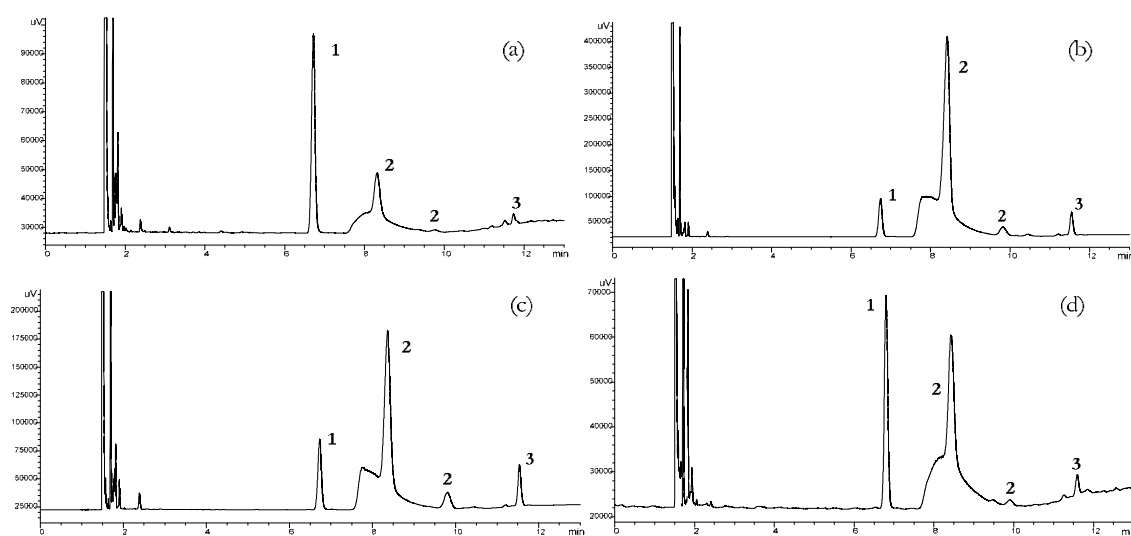


Fig. III-22.-Cromatogramas de los experimentos 1 (a); 3 (b); 6 (d); y 7 (c). 1. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 2. Lactulosa; 3. Lactosa.

Se observó un efecto pequeño en la selectividad cuando se modificaban los factores (P , T y M) para los valores del diseño experimental, aunque no se obtuvieron diferencias significativas en la pureza de la lactulosa para ninguno de los experimentos de la Tabla III-11. Este hecho apoya la idea de que las condiciones supercríticas afectan a las recuperaciones pero no a la selectividad, que está más influenciada por la composición del modificador. Se aplicó regresión lineal múltiple para estimar los parámetros propuestos en el modelo (Ecuación II-1 del apartado 2.2.2.3.3.1.) para cada una de las cuatro variables respuesta. La Figura III-23 muestra el diagrama de Pareto estandarizado para la cantidad de

Lu (Fig. III-23a) y La (Fig. III-23b) extraídas, ilustrando la importancia y la significación estadística de los diferentes factores en el modelo.

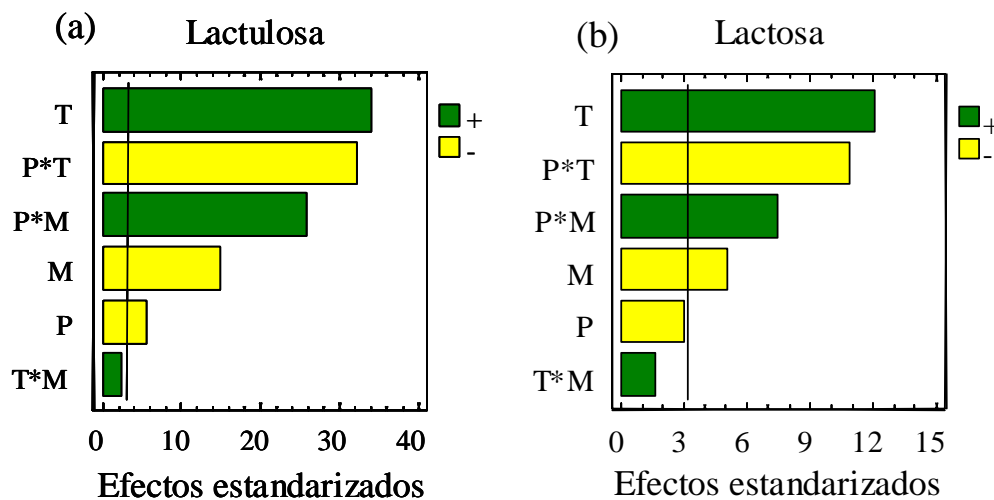


Fig. III-23.-Representación del diagrama de Pareto estandarizado con el efecto de cada variable en el modelo dividido por su error estándar para dos variables respuesta: **(a)** mg lactulosa extraída y **(b)** mg lactosa extraída. La línea vertical corresponde a los tests de significación de los efectos a un nivel de confianza del 95 %. La leyenda de las barras corresponde a las variables del modelo (P=presión de extracción, T=temperatura de extracción, M=flujo del modificador).

Los diagramas de Pareto sólo están representados para dos de las variables respuestas, cantidad extraída de lactosa y lactulosa, ya que ésta está correlacionada con la recuperación y, por tanto, la significación es similar.

Los efectos, calculados como el doble del coeficiente de regresión lineal múltiple para las variables estandarizadas, se representaron (en valor absoluto) en orden descendente. En el diagrama de Pareto se observa claramente que los términos significativamente diferentes de cero ($p < 0.05$), es decir, aquellos que tienen una fuerte influencia en las variables de respuesta, son la temperatura de extracción (T) y la interacción entre la presión de extracción y el flujo de modificador ($P \times M$). Ambos términos tienen un efecto positivo (Figura III-23), mientras que la interacción entre presión y temperatura ($P \times T$), el flujo de modificador (M) y la presión (P) tienen efectos negativos. La interacción entre temperatura y flujo de modificador ($T \times M$) no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Por tanto, en la región experimental estudiada, la cantidad de disacáridos extraídos será máxima a la temperatura de extracción más elevada y a la presión de extracción más baja. El efecto del modificador depende de la temperatura y la presión, siendo limitado por la solubilidad de la mezcla etanol/agua en CO_2 que asegura una fase supercrítica homogénea.

La Figura III-24 muestra gráficamente la tendencia de la recuperación de la lactulosa en función del contenido de modificador. A 300 bar, la recuperación de lactulosa aumenta con el porcentaje de modificador y las recuperaciones que se producen a 100 °C son claramente mayores que las que se producen a 60 °C. Cuando la presión de extracción se

reduce a 100 bar y se trabaja a altas temperaturas (100 °C), las recuperaciones de lactulosa aumentan considerablemente. Este efecto ya ha sido descrito previamente por otros autores (242) midiendo la solubilidad de fructosa en SCCO_2 ; los datos experimentales muestran un aumento de la solubilidad a presiones bajas y temperaturas altas.

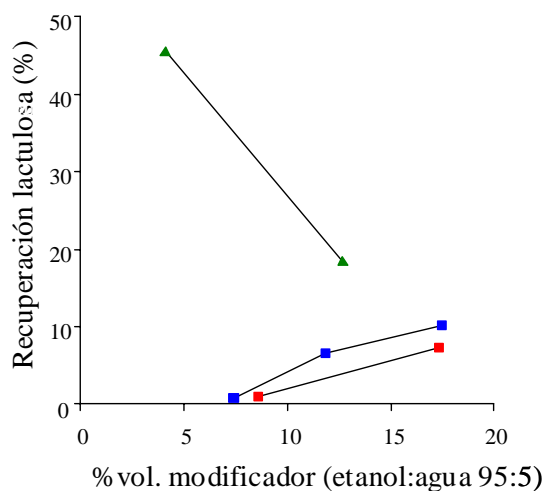


Fig. III-24.-Eficiencia de la extracción para algunos experimentos de las Tablas III-11 y III-13, función del contenido en modificador: (—■—) 300 bar y 60 °C; (—■—) 300 bar y 100 °C; (—▲—) 100 bar y 100 °C.

Como se ha comentado previamente, los términos no significativamente diferentes de cero, en este caso la interacción $T \times M$, fueron excluidos de la ecuación II-1 y el modelo matemático fue reajustado. Los resultados se muestran en la Tabla III-12, incluyendo la siguiente información: los factores no escalados, el coeficiente de determinación (R^2), la desviación estándar residual, los valores de p de la falta de ajuste del modelo y la desviación estándar residual (RRSD).

Tabla III-12. Coeficientes de regresión para factores no escalados y estadísticos obtenidos por ajuste de regresión lineal múltiple.

Variables del modelo	Variables de respuesta			
	Cantidad Lu (mg)	Cantidad La (mg)	Recuperación Lu (%)	Recuperación La (%)
Constante	-39.3823	-2.1031	-56.2487	-7.04441
	0.108712*	0.005864*	0.155278	0.019814
T	1.18197*	0.055105*	1.68833	0.183708
M	-157.143*	-6.171*	-224.467	-20.4353
$P*T$	-0.003863*	-0.000177*	-0.005518	-0.000590
$P*M$	0.61506*	0.02332*	0.87864	0.077144
Parámetros estadísticos para ver la bondad del ajuste del modelo				
R^2	0.997	0.984	0.997	0.984
RSD	0.716	0.086	1.025	0.286
	0.39	0.17	0.39	0.17
RRSD (%)	9.8	28.6	3.7	16.8

R^2 , coeficiente de determinación; RSD, desviación estándar residual; p , valor de la falta de ajuste del test al modelo; RRSD, desviación estándar residual expresada como porcentaje del valor medio de la respuesta.

De estos resultados se deducen las siguientes conclusiones: los cuatro modelos estimados fueron adecuados para describir los resultados (valores de p de falta de ajuste > 0.05); la fracción de variación de la variable respuesta explicada por el modelo (R^2) fue superior a 0.98 para las respuestas relacionadas con la lactosa y superiores a 0.99 cuando estaba involucrada la lactulosa. Los valores de RSD, expresados como porcentaje del valor de la media de la respuesta ($RRSD(\%) = 100RSD/\bar{Y}$), proporciona una medida del error relativo del ajuste. Los valores (Tabla III-12) fueron inferiores a 10 % para las extracciones de lactulosa (que es el componente mayoritario en la mezcla y es el que debe ser maximizado) y superior a 15 % para las respuestas que incluían lactosa (que se extrae en pequeñas cantidades y por lo tanto es de esperar que el error experimental dé valores elevados).

La Figura III-25 muestra la representación de la superficie de respuesta de las variables estudiadas (Lu (mg) y La (mg)) en función de la presión y la temperatura, considerando el menor flujo de modificador empleado ($M=0.2$). Estos gráficos sirven para predecir visualmente futuras respuestas y para determinar los valores de los factores que optimizan la respuesta.

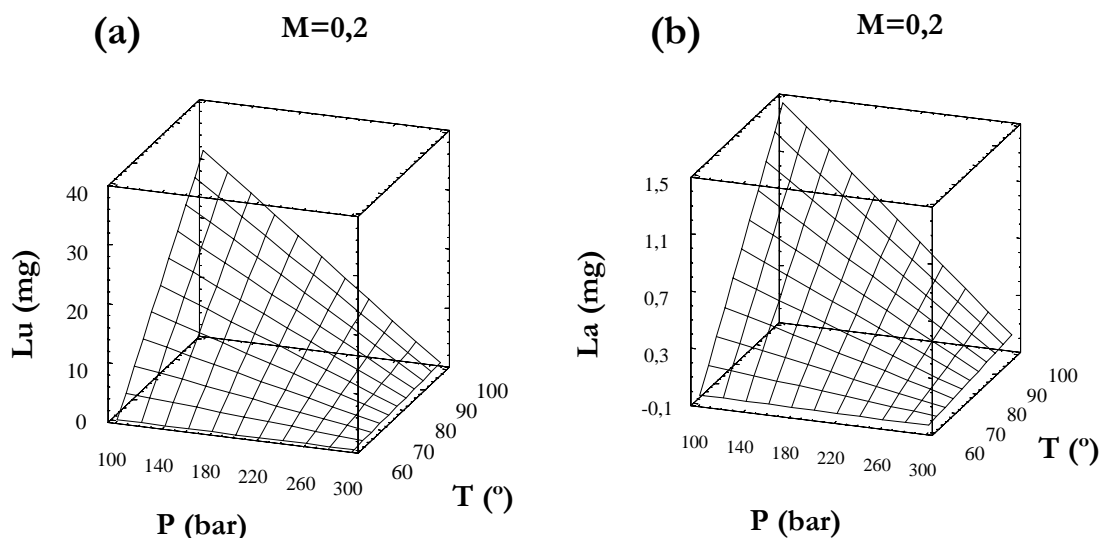


Fig. III-25.-Representación de la superficie de respuesta para las variables estudiadas: **(a)** mg lactulosa extraída (Lu (mg)) y **(b)** mg lactosa extraída (La (mg)) con flujo del modificador a 0.2 mL/min.

Analizando las figuras puede observarse que un incremento en la temperatura lleva aparejado un aumento de la cantidad extraída, si la presión de extracción es baja; este comportamiento, como ya ha sido comentado anteriormente, ha sido observado por otros autores en monosacáridos (252) y coincide plenamente con los resultados obtenidos en la medida de solubilidad de carbohidratos en condiciones supercríticas (apartado 3.2).

La Tabla III-13 muestra las condiciones óptimas proporcionadas por el modelo ajustado (tabla anterior): 100 bar, 100 °C y 0.2 mL/min y compara el valor observado (obtenido experimentalmente) con los valores predichos. En la tabla también se muestran los valores observados y predichos en algunos experimentos que no se han llevado a cabo en las condiciones óptimas.

Tabla III-13. Mg de Lu extraída. Valores observados y predichos obtenidos por regresión lineal múltiple en varios experimentos incluyendo el realizado en condiciones óptimas.

	Temperatura (°C)	Presión (bar)	M (mL/min)	Mg Lu observado	Mg Lu predicho	Mg La observado	Mg La predicho
1	100 ^a	100 ^a	0.2 ^a	29.41	31.93	1.22	1.46
2	200	60	0.2	0.48	0.10	0.01	0.0
3	300	80	0.2	0.83	0.56	0.03	0.0
4	300	100	0.3	4.66	3.76	0.11	0.12

^a Extracción en condiciones óptimas predicha por el modelo de regresión lineal múltiple.

Como se puede observar, las condiciones óptimas corresponden con la densidad más baja del fluido supercrítico estudiado, siempre y cuando se trabaje con temperaturas suficientes para llevar a cabo una extracción homogénea en medio supercrítico; considerando un flujo de CO₂ constante, el flujo más bajo de modificador (0.2 mL/min) representa alrededor de un volumen del 4 % en la mezcla supercrítica. En esas condiciones óptimas, el valor predicho fue de 31.9 mg de lactulosa (45 % de recuperación) mientras que el valor obtenido experimentalmente fue 29.42 mg, es decir, un error del 8.5 %. Considerando la desviación estándar relativa, s , obtenida por repeticiones en Tabla III-13 (0.63 para lactulosa y 0.05 para lactosa), se observan grandes diferencias entre los valores observados y predichos cuando la cantidad extraída es menor o está alrededor de s (experimentos 2 y 3, Tabla III-13); esas diferencias disminuyen cuando las cantidades de carbohidratos extraídas aumentan (experimentos 1 y 4, Tabla III-13), estando estos valores lejos de la desviación estándar relativa.

La Figura III-26 muestra los valores observados *versus* los valores predichos por el modelo, tanto para los mg de lactulosa (Figura III-24a), como para los mg de lactosa (Figura III-24b). De la Figura III-24 y la Tabla III-13 se puede afirmar que existe una correlación muy buena entre experimentos que proporcionan valores altos y error experimental (desviación estándar relativa) bajo, indicando la posibilidad de usar este modelo matemático para predecir los valores respuesta dentro de la región experimental.

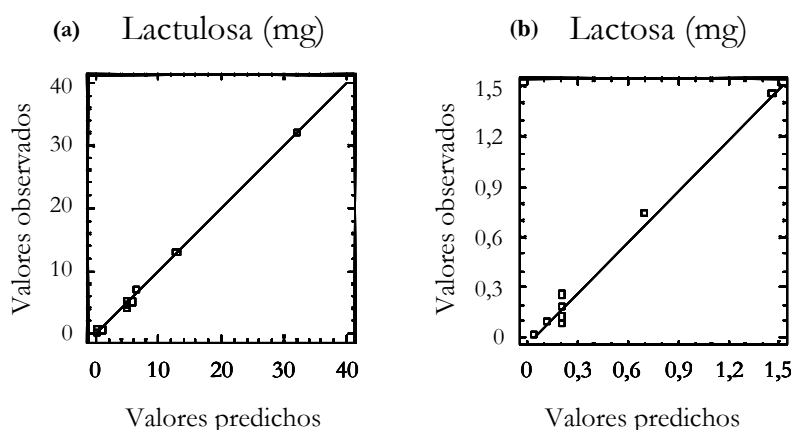


Fig. III-26.-Valores observados *versus* estimados por el modelo de regresión lineal múltiple.

Es importante destacar que los máximos obtenidos por el modelo corresponden a los valores de máxima solubilidad de lactulosa obtenidos en los experimentos detallados en el apartado 3.2, tal y como era de esperar.

3.3.1.2. *Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas. Estudio del proceso para mezclas tagatosa/galactosa*

Tomando como base los resultados obtenidos en la medida de solubilidad de los diferentes carbohidratos en condiciones supercríticas, se diseñó un estudio equivalente al mostrado en el apartado anterior para evaluar la viabilidad de la separación de tagatosa de sus mezclas con galactosa.

3.3.1.2.1. *Selección de la composición del modificador*

Como ya se ha mencionado en el análisis de los resultados de solubilidad para los diferentes carbohidratos, variaciones en la polaridad del modificador tienen efectos significativos en la solubilidad relativa de la tagatosa frente a la galactosa. Por ello se estudió el comportamiento de varios alcoholes y mezclas etanol/agua, tal y como se muestra en la Tabla III-14 (los experimentos se realizaron por triplicado y el valor que se presenta en la Tabla III-14 es la media de todos ellos). Como era de esperar, se produjo un notable incremento en la cantidad total de carbohidratos extraídos al aumentar la polaridad del modificador. Sin embargo, al aumentar el rendimiento de la extracción, disminuía la selectividad hacia la extracción de tagatosa. En el caso de disolventes muy polares (metanol y etanol/agua 90:10), la composición de la mezcla extraída era muy similar a la de la mezcla de partida. No se encontraron diferencias significativas en la composición de los extractos obtenidos usando etanol, *n*-propanol, isopropanol y *n*-butanol como modificadores. Con el objetivo de comprobar si el incremento de la cantidad de galactosa en la muestra afectaba a la cantidad de carbohidrato total extraído o a la extracción selectiva de tagatosa se

prepararon muestras con relaciones Ta/Ga 30:70. Como se puede observar en la Tabla III-14, el incremento del contenido inicial de galactosa en la muestra no afecta ni a la cantidad de carbohidrato extraído ni a la selectividad de la extracción.

Tabla III-14. Efecto del tipo de modificador y la composición de las muestras extraídas en la extracción selectiva de la tagatosa (300 bar, 80 °C, 0.6 mL/min).

Modificador	mg extraídos	% Ta extracto	% Ga extracto	Recuperación Ta (%)	Recuperación Ga (%)
<i>n</i> -Butanol ^a	36.460	90.06	9.94	52.06	13.40
<i>n</i> -Propanol ^a	41.304	89.72	10.28	52.94	14.16
Isopropanol ^a	59.318	88.23	11.77	74.77	23.27
Etanol ^a	64.780	87.30	12.70	80.78	27.43
Etanol:agua ^a (95:5 v/v)	77.651	84.91	15.09	94.18	39.07
Etanol:agua ^b (90:10 v/v)	153.677	77.85	22.15	85.46	56.73
Metanol ^b	171.083	72.96	27.04	89.14	77.13
Isopropanol ^c	56.377	87.41	12.59	82.12	5.07
Isopropanol ^b	57.662	88.77	11.23	73.12	21.05
Etanol ^c	58.777	79.31	20.69	77.49	8.77

^a Composición inicial de la muestra: 1 parte de Ta/Ga 70:30 y 9 partes de arena de mar.

^b Composición inicial de la muestra: 1 parte de Ta/Ga 70:30 y 4 partes de arena de mar.

^c Composición inicial de la muestra: 1 parte de Ta/Ga 30:70 y 4 partes de arena de mar.

En la Figura III-27 se muestran los cromatogramas de los extractos obtenidos empleando los alcoholes estudiados como modificadores.

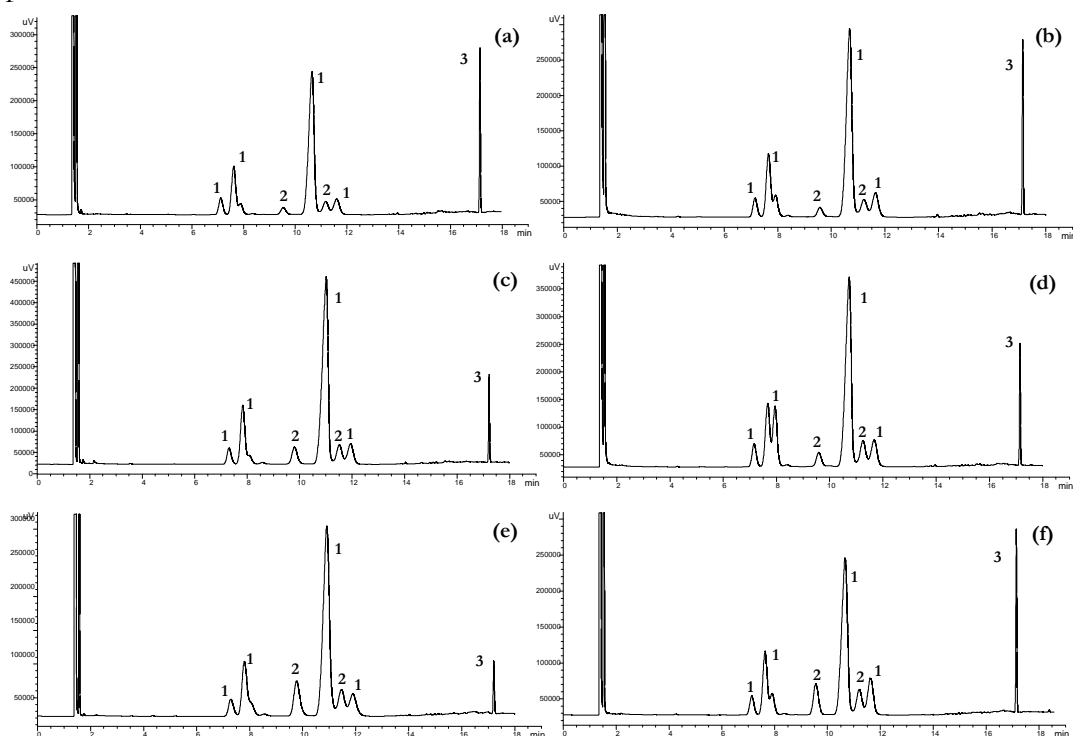


Fig. III-27.-Cromatogramas de las extracciones supercríticas de las mezclas tagatosa-galactosa 70/30 (% en peso) empleando como modificador: *n*-butanol (a); *n*-propanol (b); isopropanol (c); etanol (d); etanol/agua (90/10, v/v) (e); y metanol (f). 1. Tagatosa; 2. Galactosa; 3. Patrón interno (β -fenil-glucósido).

A la vista de los resultados obtenidos en cuanto a pureza de tagatosa y rendimiento de extracción, se eligió en un primer momento el isopropanol como modificador para realizar los experimentos, ya que se esperaba que proporcionara rendimientos elevados para los monosacáridos y una selectividad suficiente.

3.3.1.2.2. Efecto de los factores

En la Tabla III-15 aparecen los resultados de la matriz del diseño experimental descrita en el apartado 2.3.3.2. de materiales y métodos. Los experimentos 15 al 17 corresponden a los ensayos que se llevaron a cabo por triplicado (punto central). Se obtuvo tagatosa con un alto valor de pureza en todos los experimentos realizados, no observándose diferencias significativas entre experimentos en relación con la pureza de la tagatosa obtenida.

Tabla III-15. Resultados obtenidos para la matriz del diseño experimental (cantidad total extraída, composición porcentual de Ta en el extracto, composición porcentual de Ga en el extracto y recuperación de Ta y Ga respecto a las cantidades iniciales de cada carbohidrato).

Factores				Variables de respuesta				
Exp. No.	P (bar)	T (°C)	M (mL/min)	cantidad extraída (mg)	% Ta extracto	% Ga extracto	Recuperación Ta (%)	Recuperación Ga (%)
1	100	60	0.2	0.743	90.99	9.01	0.97	0.22
5 ^a	100	60	0.4	-	-	-	-	-
9	100	80	0.3	7.722	88.82	11.18	9.80	2.88
3	100	100	0.2	1.037	88.06	11.94	1.30	0.41
7	100	100	0.4	22.116	88.72	11.28	27.09	10.50
11	200	60	0.3	5.013	92.09	7.91	6.59	1.32
13	200	80	0.2	4.287	90.98	9.02	5.57	1.29
15	200	80	0.3	6.601	87.92	12.08	8.29	2.66
16	200	80	0.3	5.303	90.72	9.28	6.87	1.64
17	200	80	0.3	6.270	88.56	11.44	7.93	2.39
14	200	80	0.4	23.070	90.39	9.61	29.79	7.39
12	200	100	0.3	7.853	90.95	9.05	9.85	2.28
2	300	60	0.2	2.135	90.51	9.49	2.76	0.68
6	300	60	0.4	28.845	91.32	8.68	37.63	8.35
10	300	80	0.3	8.738	91.47	8.53	11.42	2.49
4	300	100	0.2	4.810	91.80	8.20	6.31	1.31
8	300	100	0.4	27.142	88.55	11.45	34.33	10.36

^a Experimento realizado en dos fases (líquido vapor) que no fue considerado en el análisis estadístico.

La regresión lineal múltiple se utilizó para estimar los parámetros del modelo propuesto (ecuación II-2 apartado 2.2.2.3.3.2. del capítulo 2, materiales y métodos) para cada una de las dos variables respuesta consideradas, relacionadas con la cantidad de monosacáridos extraídos. En la Figura III-28 se muestran los cromatogramas de las extracciones 1 y 6 (mínima y máxima recuperación de tagatosa).

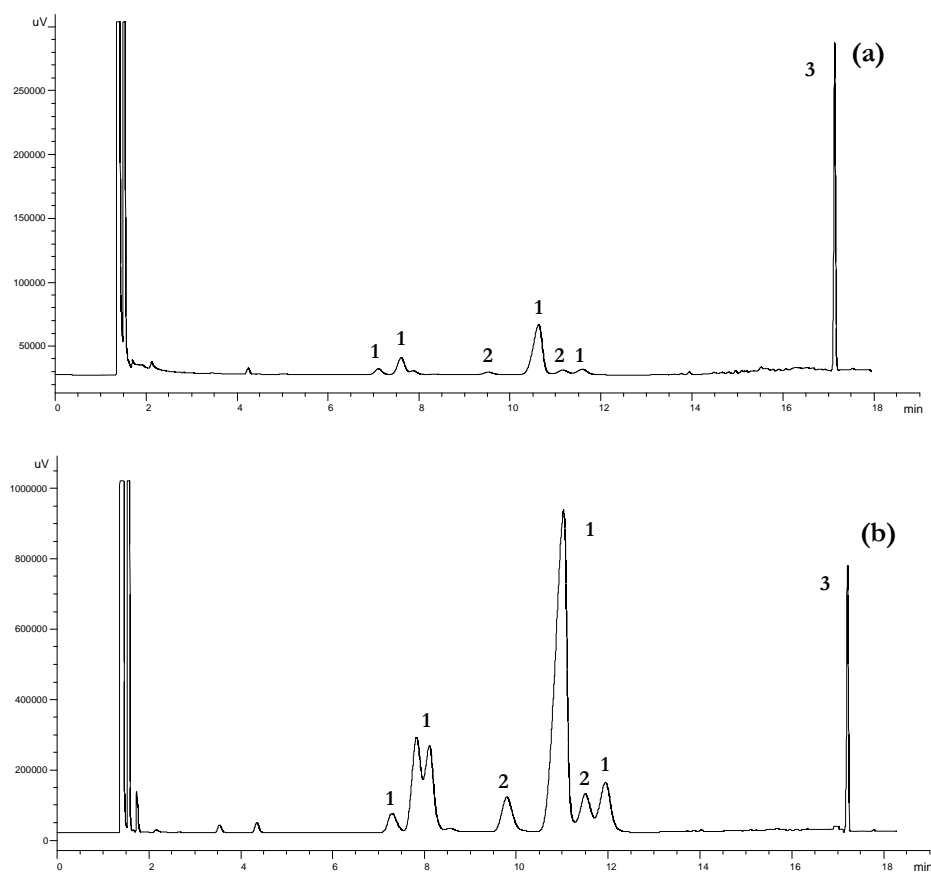


Fig. III-28.-Cromatogramas de los experimentos 1 (a); 6 (b) de la Tabla III-17; 1. Tagatosa; 2. Galactosa; 3. Patrón interno (β -fenil-glucósido).

A excepción del experimento 5, donde el disolvente no era una fase homogénea, el resto de combinaciones de P , T y M parece razonable ajustarlos a un modelo matemático para expresar el fraccionamiento de monosacáridos bajo condiciones de extracción supercríticas. La Figura III-29 muestra el diagrama de Pareto estandarizado para las cantidades de tagatosa (T_a) y galactosa (G_a) extraídas, mostrando la importancia y la significación estadística de los diferentes términos del modelo.

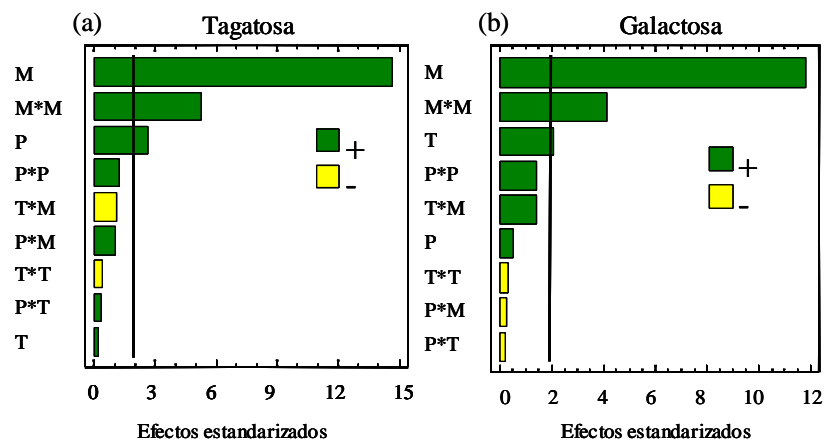


Fig. III-29.-Representación del diagrama de Pareto estandarizado con el efecto de cada variable en el modelo dividido por su error estándar para dos variables respuesta: (a) mg tagatosa extraída y (b) mg galactosa extraída. La línea vertical corresponde a los tests de significación de los efectos a un nivel de confianza del 95 %. La leyenda de las barras corresponde a las variables del modelo (P =presión de extracción, T =temperatura de extracción, M =flujo del modificador).

En la Figura III-29, como en el caso anterior para las mezclas lactulosa-lactosa, sólo están representadas las cantidades de tagatosa y galactosa extraídas, ya que las recuperaciones están correlacionadas con ellas. Los efectos, calculados como el doble del coeficiente de regresión lineal múltiple para las variables estandarizadas, se representaron (en valor absoluto) en orden descendente. Los términos que tienen mayor influencia en las variables respuesta son, para la extracción de tagatosa, el modificador (M), su término cuadrático ($M \times M$) y la presión de extracción (P), mientras que para la extracción de galactosa también es significativa la temperatura de extracción (T). Todos ellos tienen efecto positivo (Figura III-29). Esto significa que, en la región experimental estudiada, la cantidad de carbohidratos extraída será máxima aumentando la cantidad de modificador mientras se mantenga el disolvente de extracción en condiciones supercríticas. Un incremento en la presión o en la temperatura de extracción también redundará en un aumento de los carbohidratos extraídos.

La Tabla III-16 muestra los resultados del modelo matemático reajustado por regresión lineal múltiple después de eliminar los términos no significativamente diferentes de cero; incluye la siguiente información: los factores no escalados, el coeficiente de determinación (R^2) y la desviación estándar residual (RSD). De estos valores se deduce que la fracción de la variación de la respuesta explicada por el modelo (R^2) fue superior al 96 %.

Tabla III-16. Coeficientes de regresión para factores no escalados y estadísticos obtenidos por ajuste de regresión lineal múltiple.

Variables respuesta:		
Variabes del modelo	Cantidad Ta (mg)	Cantidad Ga (mg)
Constante	32.3957	4.9681
P	-0.01138*	-
T	-	-0.01339*
M	-276.007*	-39.719*
$P \times P$	-	-
$T \times T$	-	-
$M \times M$	586.107*	75.675*
$P \times T$	-	-
$P \times M$	0.10015**	-
$T \times M$	-	0.07837**
Parámetros estadísticos para ver la bondad del ajuste del modelo		
R^2	0.973	0.965
RSD	1.502	0.230

^a R^2 , coeficiente de determinación; RSD, desviación estándar residual; * coeficiente de regresión significativamente diferente de cero, $p < 0.05$; ** coeficiente de regresión significativamente diferente de cero, $p < 0.10$.

En la Figura III-30 se muestra la representación de la superficie de respuesta para las dos variables seleccionadas (cantidades de tagatosa y galactosa). La cantidad de tagatosa se representa en función de la presión y el modificador y considerando un valor medio de la temperatura (80 °C). Por otro lado, la cantidad de galactosa se muestra en función de la temperatura y del modificador, considerando una presión media, que en este caso corresponde a 200 bar.

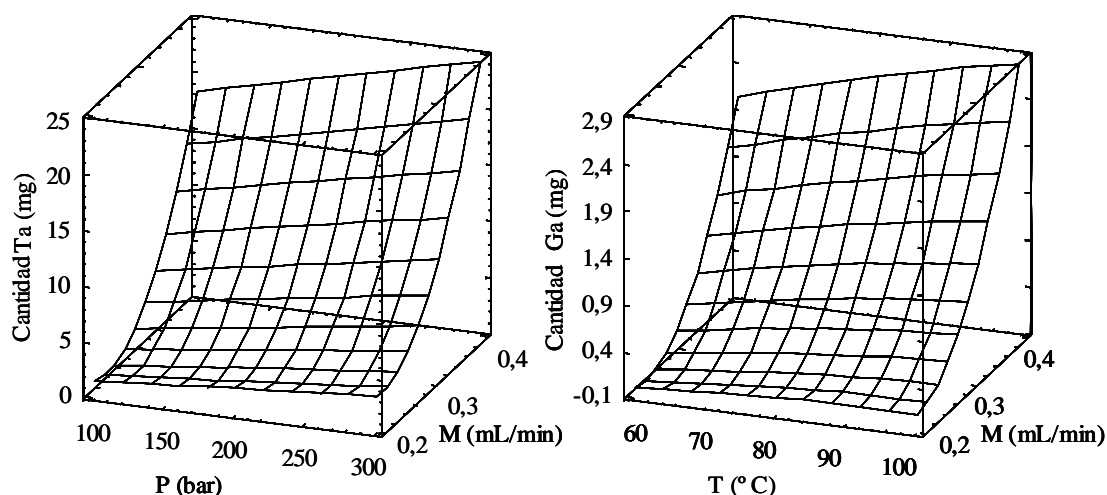


Fig. III-30.-Representación de la superficie de respuesta para las variables seleccionadas: miligramos de tagatosa extraída (Ta (mg)) y miligramos de galactosa (Ga (mg)). Para Ta, $T=80$ °C, y para Ga $P=200$ bar.

Analizando los gráficos y considerando que el objetivo era maximizar la cantidad de tagatosa extraída, se puede observar que un aumento en el flujo del modificador da lugar a un gran incremento en la cantidad de tagatosa recuperada de la mezcla, mientras que un aumento de la presión da lugar sólo a un ligero aumento de la cantidad extraída. Las condiciones óptimas de extracción para conseguir la máxima recuperación de tagatosa proporcionadas por el programa estadístico utilizado para ajustar el modelo (ver Tabla III-16), fueron las siguientes: presión de extracción 300 bar, temperatura de extracción 60 °C y flujo de modificador 0.4 mL/min. Usando estas condiciones, el valor predicho fue de 24.37 mg (35 % de recuperación). También es verdad que a esas condiciones se recupera la máxima cantidad de galactosa, pero considerando que la selectividad se afinó previamente eligiendo la cantidad apropiada de modificador, significa que sólo hay el 8 % de galactosa en la mezcla final. Por otro lado, siempre que el flujo empleado fue el máximo explorado (0.4 mL/min), según el diseño experimental, se obtuvieron rendimientos altos de tagatosa, lo que coincide con la tendencia mostrada en los datos de solubilidad en condiciones supercríticas al aumentar el flujo de modificador de 0.2 a 0.6 mL/min (Tabla III-15). Como se puede ver, las condiciones óptimas coinciden con las del experimento 6 del diseño experimental y con los datos obtenidos en la medida de solubilidad en condiciones

supercríticas (Tabla III-15). La cantidad de tagatosa recuperada fue de 26.34 mg (37 % de recuperación), lo cual implica un 7 % de error respecto al valor predicho.

En la Figura III-31 se muestra la recuperación de tagatosa (%), en algunas de las condiciones experimentales, en función de la cantidad de isopropanol presente en SCCO₂. Los diferentes símbolos corresponden a diferentes flujos de modificador (M) y las líneas representan extracciones llevadas a cabo a la misma temperatura y presión y que corresponden a una densidad constante del CO₂ de 189, 662 y 830 kg/m³ respectivamente. Como se deduce de la Figura III-29, la cantidad de isopropanol presente en la fase supercrítica tiene un efecto significativo en la recuperación de tagatosa, mostrando un incremento casi lineal del rendimiento al aumentar el contenido de modificador. Por otro lado, la densidad de la fase supercrítica tiene un efecto menor en la cantidad de tagatosa extraída. La recuperación de tagatosa puede aumentarse incluso con bajas densidades de CO₂ si existe cantidad suficiente de isopropanol disuelto en el CO₂. De esta manera, a bajas densidades de CO₂, la extracción de tagatosa está limitada por la cantidad de isopropanol que se puede disolver en CO₂ manteniéndose la fase supercrítica homogénea. Cuando la densidad de CO₂ aumenta, es posible disolver mayor cantidad de isopropanol en la fase supercrítica y la recuperación de tagatosa aumenta considerablemente.

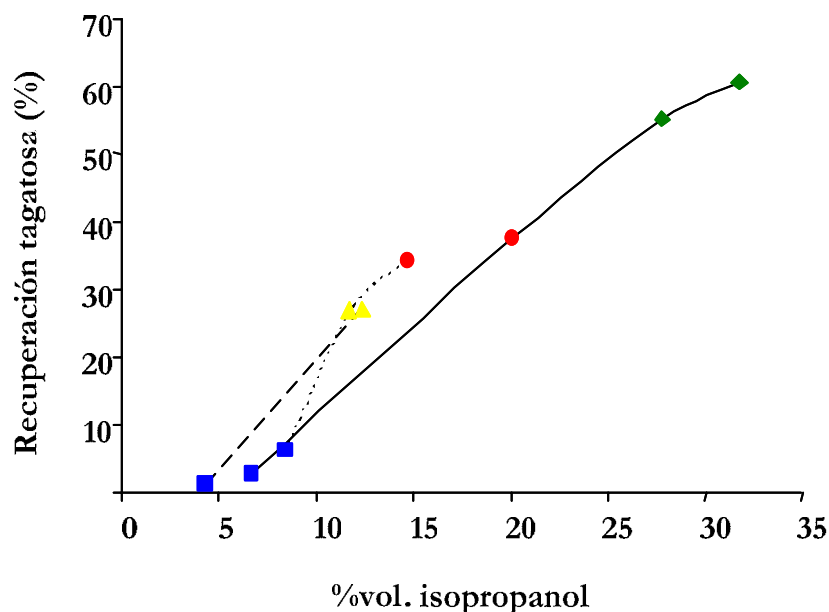


Fig. III-31.-Recuperación de tagatosa obtenida en los experimentos, función de la cantidad (%vol.) de isopropanol presente en la fase supercrítica. Flujo de modificador: (■) 0.2 mL/min; (▲) 0.3 mL/min; (●) 0.4 mL/min; (◆) 0.6 y 0.7 mL/min. Constante CO₂ líneas de densidad: (—) 300 bar, 60 °C (ρ_{CO_2} = 830 kg/m³); (·····) 300 bar, 100 °C (ρ_{CO_2} = 662 kg/m³) y (— · —) 100 bar, 100 °C (ρ_{CO_2} = 189 kg/m³).

Para tener un proceso verdaderamente viable, se llevaron a cabo experimentos adicionales fuera del dominio experimental para mejorar la recuperación (37%) de la tagatosa extraída. La Tabla III-17 muestra las condiciones experimentales probadas y las

cantidades de tagatosa y galactosa extraídas, así como el porcentaje de cada monosacárido en la mezcla.

Tabla III-17. Ensayos adicionales a flujos de modificador mayores que en el diseño experimental inicial, usando una mezcla tagatosa-galactosa 70/30 ps.

P (bar)	T (°C)	M (mL/min)	Cantidad extraída (mg)	% Ta extracto	% Ga extracto	Recuperación Ta (%)	Recuperación Ga (%)
300	60	0.6	42.351	91.21	8.79	55.18	12.41
300	60	0.7	47.308	89.70	10.30	60.62	16.23
300	80	0.6	59.318	88.23	11.77	74.77	23.27
300	80	0.7	55.750	90.55	9.45	72.15	17.48

Como puede verse, para llevar a cabo estos experimentos se seleccionaron las presiones más elevadas y temperaturas medias; esto es debido a que la cantidad de modificador que se probó fue alrededor del 30 % en volumen de la fase supercrítica, y para ello se necesitaban temperaturas iguales o superiores a 60 °C para mantener la fase supercrítica homogénea. Por consiguiente se hicieron los experimentos a 60 y 80 °C y los flujos de modificador fueron 0.6 y 0.7 mL/min (los cromatogramas aparecen en la Figura III-32).

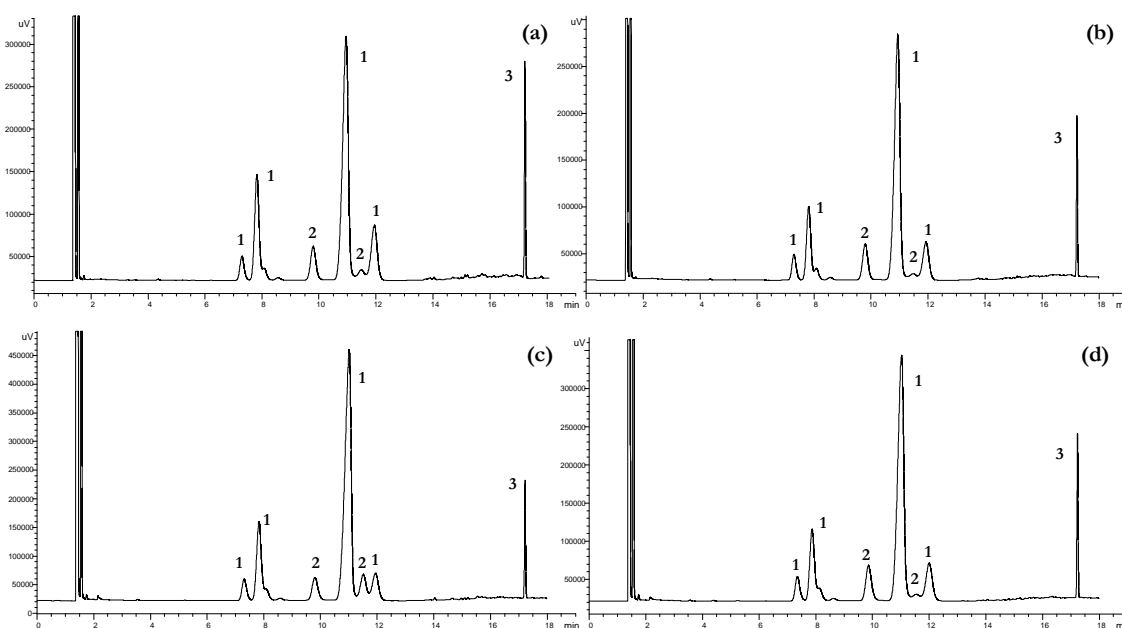


Fig. III-32.-Cromatogramas de los experimentos 300 bar/80 °C/0.6 mL·min⁻¹ (a); 300 bar/60 °C/0.7 mL·min⁻¹ (b); 300 bar/80 °C/0.6 mL·min⁻¹ (c); 300 bar/80 °C/0.7 mL·min⁻¹ (d);
1. Tagatosa; 2. Galactosa; 3. Patrón interno (β -fenil-glucósido).

Como se puede observar, aunque la selectividad se mantuvo casi constante en todos los experimentos, la cantidad extraída aumentó con la cantidad de modificador añadido al CO₂. La máxima extracción de tagatosa se obtuvo a 300 bar y 80 °C con un flujo de modificador de 0.6 ó 0.7 mL/min (Figura III-32). El incremento de 0.4 mL/min (óptimo en la región experimental proporcionada por el modelo) a 0.6 mL/min de modificador

implica un incremento de la recuperación de tagatosa de 37 % a un 75 %. No se aumentó el flujo de modificador en la mezcla supercrítica debido a limitaciones operativas.

3.3.2. Conclusiones

Se han evaluado las condiciones de extracción supercrítica y la composición de la fase supercrítica para extraer selectivamente y fraccionar mezclas de carbohidratos lactulosa/lactosa y tagatosa/galactosa. Se ha demostrado que es posible fraccionar de manera satisfactoria mezclas binarias de monosacáridos o disacáridos empleando la tecnología de extracción mediante fluidos supercríticos. En condiciones óptimas se consiguen recuperaciones satisfactorias con elevado grado de pureza. El extracto obtenido está principalmente determinado por la composición y cantidad empleada de modificador.

Para la mezcla binaria lactulosa-lactosa, la pureza de la lactulosa está influenciada principalmente por la composición (cantidad de agua disuelta) en el modificador; la presión y temperatura de extracción y la cantidad de modificador empleado determinan el rendimiento del proceso.

Empleando un modificador etanol:agua que 95:5 (v/v), se obtienen extractos que contienen una lactulosa con una pureza superior al 95% en peso seco. Aumentando la cantidad de agua en el modificador se produce una disminución severa en la pureza de la lactulosa obtenida.

Las condiciones óptimas elegidas en el estudio (100 bar, 100 °C y 0.2 mL/min de flujo de modificador) permiten la extracción de lactulosa con purezas superiores al 95 % y con recuperaciones cercanas al 50 % de la lactulosa inicial. Los modelos matemáticos obtenidos describen la variabilidad de los datos experimentales en un porcentaje superior al 98 %; esto permite la predicción de valores de respuesta con elevada precisión.

Para la mezcla tagatosa-galactosa, el rendimiento de la extracción está influenciado por la cantidad de modificador disuelto en el SCCO₂, a mayor contenido de alcohol en la fase supercrítica, mayor cantidad de monosacáridos extraídos. La cantidad de modificador que puede ser disuelto en SCCO₂ para conseguir una fase homogénea está determinada por las condiciones de extracción (presión y temperatura). Aumentando la polaridad del alcohol (por ejemplo, disminuyendo el tamaño molecular), aumenta notablemente el rendimiento de la extracción, pero se reduce de forma sustancial la selectividad hacia la tagatosa.

Después de la optimización del diseño experimental y del porcentaje de modificador, las condiciones experimentales para obtener la mayor cantidad de tagatosa extraída son 300 bar, 60 °C y 0.4 mL/min de isopropanol como modificador. Bajo estas condiciones, se consiguen recuperaciones del 37 %. Para mejorar la recuperación de tagatosa, se aumentó el flujo de modificador hasta valores cercanos al 30 % en la fase supercrítica, ya que éste era el factor que más influía en la cantidad de tagatosa extraída. Las condiciones finales

seleccionadas (300 bar, 80 °C y 0.7 mL/min de isopropanol) permitieron extraer tagatosa con una pureza superior al 90 % y unas recuperaciones superiores al 72 %.

3.4. Fraccionamiento de carbohidratos en condiciones supercríticas.

Estudio del proceso para galactooligosacáridos prebióticos

En este apartado, se utilizó la extracción en condiciones supercríticas para fraccionar selectivamente galactooligosacáridos (GOS) comerciales obtenidos a partir de un ingrediente lácteo. El mayor desafío del fraccionamiento de una mezcla comercial de carbohidratos es la combinación de los GOS con monosacáridos y disacáridos que no son prebióticos. Considerando que los beneficios para la salud de las mezclas comerciales de carbohidratos se han asociado a su contenido en GOS, la purificación y/o extracción de otros carbohidratos puede ser de gran importancia. Además, considerando que la producción de GOS a nivel industrial es costosa debido fundamentalmente al proceso de purificación al que necesariamente han de ser sometidos, la tecnología de extracción supercrítica se presenta como una alternativa para llevar a cabo este proceso de fraccionamiento y purificación.

Por tanto, el objetivo de este trabajo está centrado en el fraccionamiento de una mezcla compleja de carbohidratos en función de su grado de polimerización. Para ello, se realizaron previamente experimentos con una mezcla comercial de carbohidratos llamada Duphalac®. Esta mezcla contiene mayoritariamente lactulosa (el 74 % en peso seco), así como galactosa (12.2 % en peso seco) y lactosa (6.6 % en peso seco). Se eligió Duphalac® como punto de partida para optimizar el fraccionamiento supercrítico de mezclas complejas, para su posterior aplicación a otras mezclas de mayor complejidad (Vivinal GOS® y mezclas del apartado 3.5). Los extractos obtenidos de los distintos experimentos realizados mediante extracción por tecnología de los fluidos supercríticos estaban ligeramente enriquecidos en lactulosa (del 74 % al 81 %), incremento escaso si se comparaban con la mezcla binaria lactulosa/lactosa donde el incremento del contenido de lactulosa en el extracto pasaba del 70 al 97 %. Este pobre incremento del porcentaje de lactulosa en el extracto fue atribuido a los monosacáridos que contiene Duphalac®, que son más solubles y fáciles de extraer que la lactulosa (disacárido).

De esta experiencia se dedujo, que en mezclas complejas, será más fácil la obtención de extractos altamente enriquecidos en carbohidratos prebióticos si se eliminan, en varias etapas los diferentes carbohidratos, según su solubilidad y no según las mejores condiciones de extracción de los diferentes carbohidratos (apartado 3.3. lactulosa y tagatosa).

Además, como se ha demostrado en los apartados anteriores, la adecuada selección del modificador junto con las mejores condiciones de extracción (temperatura, presión y flujo del modificador) permiten extraer selectivamente uno u otro tipo de carbohidratos.

En este apartado, tal y como se muestra en la Figura III-33, se realizó en primer lugar un estudio de la solubilidad a presión atmosférica de la mezcla comercial de carbohidratos Vivinal GOS® en mezclas etanol/agua para elegir la composición del modificador más adecuado y posteriormente se llevaron a cabo las extracciones en condiciones supercríticas. En una primera fase se seleccionaron las condiciones de extracción más favorables y posteriormente se estudió el efecto de la cantidad de muestra empleada así como el tipo de relleno.

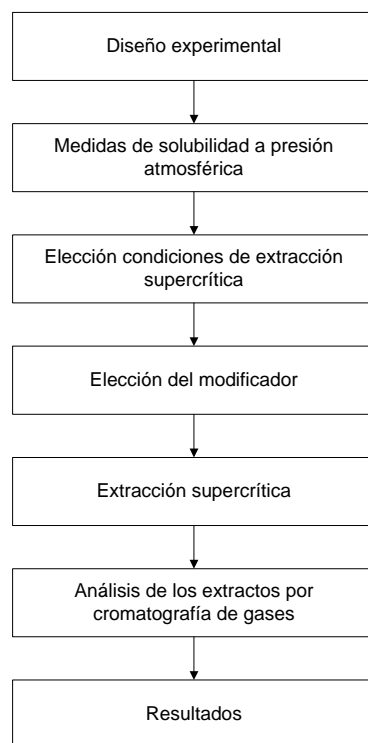


Fig. III-33.-Esquema de trabajo realizado para el fraccionamiento supercrítico de mezclas complejas de carbohidratos

3.4.1. Resultados y discusión

La composición de la mezcla, tal y como se muestra en la Figura III-34, fue la siguiente: 18.4% monosacáridos, 52.8% disacáridos, 28.3% trisacáridos y 0.5% tetrasacáridos.

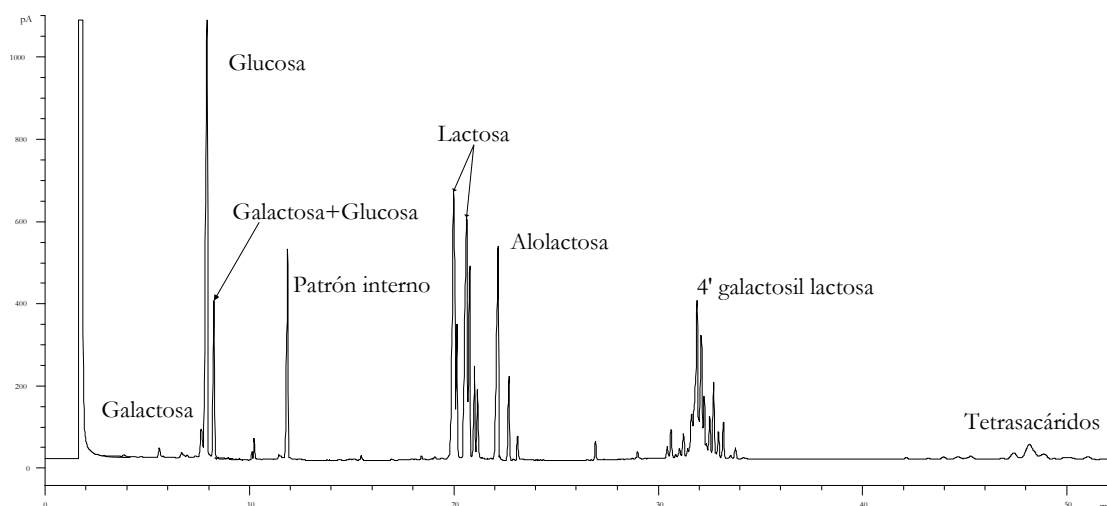


Fig. III-34.-Composición del Vivinal GOS® por cromatografía de gases.

3.4.1.1. Comportamiento de la solubilidad de la mezcla comercial de GOS en soluciones etanol/agua

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente (27-29), las mezclas etanol/agua parecen las más apropiadas para ser utilizadas como modificador con SCCO_2 en las extracciones de la mezcla comercial de GOS. El efecto de la temperatura y el contenido de agua se estudió mediante un diseño experimental, tal y como se ha detallado en el apartado 2.2.2.1.1.2.1. del capítulo 2, materiales y métodos. Las variables respuesta seleccionadas fueron los mg/mL de: monosacáridos (M), disacáridos (D) y trisacáridos (T) disueltos en la solución etanol/agua y las relaciones entre ellos (D/M y T/M), como factor para estudiar la selectividad. Los límites de los intervalos estudiados se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos (251, 253) y los valores bibliográficos disponibles (254, 255). La Tabla III-18 muestra la matriz del diseño experimental empleada, incluyendo los valores experimentales de las diferentes condiciones estudiadas y los resultados obtenidos para las diferentes variables respuesta.

Tabla III-18. Matriz del diseño experimental empleado incluyendo las condiciones estudiadas y los valores experimentales.

Factores			Variables respuesta							
Exp. No.	% agua (v)	T (°C)	mg/mL M	% M	mg/mL D	% D	mg/mL T	% T	mg/mL D/ mg/mL M	mg/mL T/ mg/mL M
1	8.66	37	7.70	37.4	10.29	49.9	2.62	12.7	1.336	0.255
2	30	30	10.77	41.4	11.84	45.5	3.42	13.1	1.099	0.289
3	8.66	24	4.89	41.7	5.44	46.4	1.40	11.9	1.113	0.257
4	17.5	40	9.88	37.7	12.55	47.9	3.78	14.4	1.270	0.301
5	17.5	30	5.40	38.1	6.93	48.8	1.86	13.1	1.283	0.268
6	26.34	37	10.19	38.6	12.46	47.2	3.74	14.2	1.223	0.300
7	17.5	22	5.38	38.8	6.87	49.5	1.62	11.7	1.277	0.236
8	5	30	4.57	38.3	6.04	50.7	1.31	11.0	1.322	0.217
9	17.5	30	5.31	38.7	6.80	49.6	1.61	11.7	1.281	0.237
10	26.34	24	7.97	41.1	9.43	48.6	2.01	10.4	1.183	0.213
11	8.66	37	7.84	37.2	10.56	50.1	2.68	12.7	1.347	0.254
12	30	30	10.84	41.4	11.96	45.6	3.40	13.0	1.103	0.284
13	8.66	24	5.01	42.7	5.40	46.0	1.33	11.3	1.078	0.246
14	17.5	40	10.01	37.8	12.68	47.8	3.81	14.4	1.267	0.301
15	17.5	30	5.42	37.6	6.98	48.4	2.02	14.0	1.288	0.289
16	26.34	37	10.15	37.9	12.55	46.9	4.07	15.2	1.237	0.324
17	17.5	22	5.27	38.6	6.81	49.9	1.57	11.5	1.292	0.231
18	5	30	4.70	38.0	6.30	50.9	1.38	11.1	1.340	0.219
19	17.5	30	5.38	37.7	6.95	48.7	1.95	13.7	1.292	0.281
20	26.34	24	8.07	41.2	9.58	48.9	1.94	9.9	1.187	0.203
21	5.25	30	5.31	38.8	6.70	49.0	1.66	12.1	1.262	0.313
22	2.63	40	4.43	39.2	5.92	52.3	0.96	8.5	1.336	0.217
23	4.48	37	6.57	39.6	8.27	49.9	1.73	10.4	1.259	0.263
24	0.30	30	2.10	66.0	1.08	34.0	0.00	0.0	0.514	0.000
25	4.48	23	4.16	38.5	5.31	49.1	1.34	12.4	1.276	0.322
26	0.77	23	1.70	62.0	1.04	38.0	0.00	0.0	0.612	0.000
27	2.63	20	2.01	59.5	1.37	40.5	0.00	0.0	0.682	0.000
28	0.77	37	2.45	56.8	1.86	43.2	0.00	0.0	0.759	0.000
29	2.63	30	2.56	57.5	1.89	42.5	0.00	0.0	0.738	0.000
30	2.63	30	2.49	56.5	1.92	43.5	0.00	0.0	0.771	0.000
31	5.25	30	5.42	39.4	6.82	49.5	1.53	11.1	1.258	0.282
32	2.63	40	4.48	40.4	5.82	52.5	0.79	7.1	1.299	0.176
33	4.48	37	6.62	39.6	8.35	50.0	1.73	10.4	1.261	0.261
34	0.30	30	1.74	61.9	1.07	38.1	0.00	0.0	0.615	0.000
35	4.48	23	4.40	39.2	5.63	50.1	1.20	10.7	1.280	0.273
36	0.77	23	1.73	62.5	1.04	37.5	0.00	0.0	0.601	0.000
37	2.63	20	2.07	62.2	1.26	37.8	0.00	0.0	0.609	0.000
38	0.77	37	2.55	57.3	1.90	42.7	0.00	0.0	0.745	0.000
39	2.63	30	2.33	56.1	1.82	43.9	0.00	0.0	0.781	0.000
40	2.63	30	2.4	55.9	1.89	44.1	0.00	0.0	0.788	0.000

Como era de esperar, la cantidad de carbohidratos disueltos en la mezcla etanol/agua aumenta cuando aumenta el % de agua y la temperatura. Sin embargo, se encontró un comportamiento diferente en cuanto a la selectividad. Analizando los resultados de la Tabla III-18, se deduce que se consigue una composición muy similar de carbohidratos disueltos cuando el contenido de agua es superior al 5 %. La Figura III-35 muestra los carbohidratos disueltos en las diferentes condiciones experimentales en función del contenido de agua; como se puede observar, cuando el contenido de agua es superior al 5 % hay un

enriquecimiento de monosacáridos (del 18.4 % de la mezcla comercial de GOS hasta alrededor del 40 % en etanol/agua) y un empobrecimiento de trisacáridos (del 28.3 % hasta alrededor del 10 %), mientras que el contenido de disacáridos permanece casi constante (~ 50 %). Por lo tanto, las relaciones disacáridos/monosacáridos y trisacáridos/monosacáridos permanecen casi invariables cuando el contenido de agua es próximo o superior al 5 % (ver Tabla III-18).

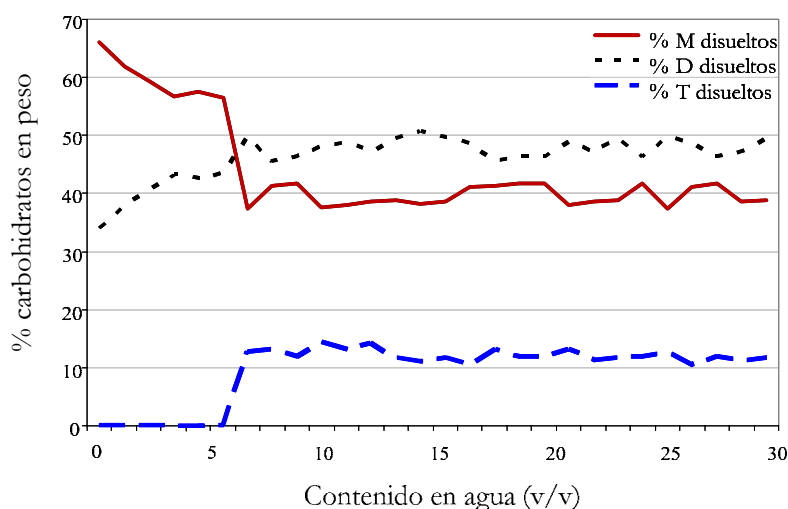


Fig. III-35.-Composición de los carbohidratos disueltos en las mezclas etanol/agua en función del contenido en agua.

Pero cuando el contenido en agua es menor del 5 %, se observa un enriquecimiento de los monosacáridos respecto a los disacáridos (relación disacáridos/monosacáridos menor que 1) mientras que no se disuelven trisacáridos o carbohidratos de mayor grado de polimerización (ver Tabla III-18). La Figura III-36 muestra los cromatogramas de los experimentos 8 (contenido de agua superior al 5 %) y 24 (contenido de agua inferior al 5 %), donde se ven claramente las diferencias de solubilidad en función del contenido en agua.

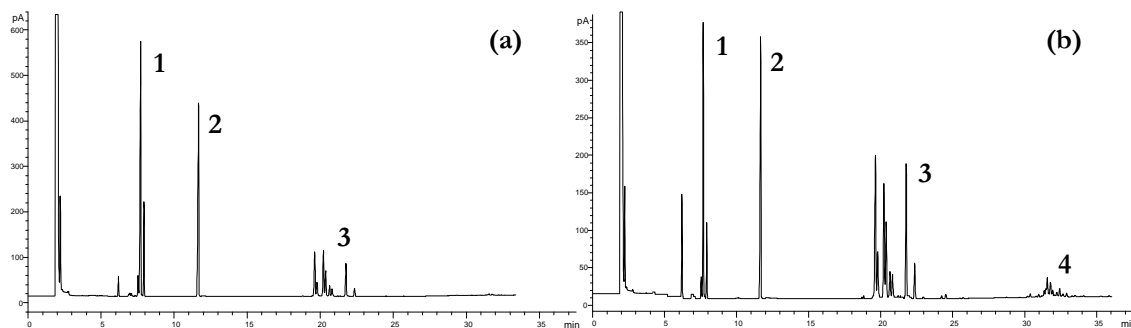


Fig. III-36.-**(a)** Cromatograma experimento 8; **(b)** Cromatograma experimento 24; 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.

Por consiguiente, y de acuerdo con las solubilidades observadas, puede suponerse que si se emplea, en el proceso de extracción supercrítica con SCCO₂, un modificador etanol/agua con menos del 5 % en agua, sería posible extraer selectivamente los diferentes carbohidratos (según grado de polimerización) presentes en la mezcla comercial de GOS.

Las Figuras de la III-37 a la III-40 muestran la influencia de los diferentes factores del diseño experimental en la selectividad (disacáridos/monosacáridos y trisacáridos/monosacáridos respectivamente) cuando se consideran mezclas de etanol/agua entre el 0 y 5 % de contenido en agua. Como era de esperar, el factor que más influye en la selectividad es el % de agua (*W*) seguido por la temperatura (*T*).

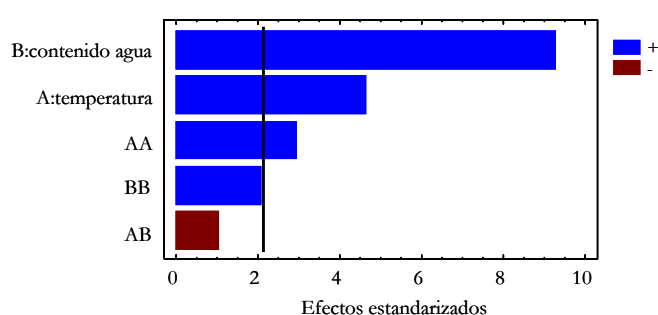


Fig. III-37.-Variable respuesta mg/mL disacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Diagrama de Pareto con el efecto de cada término en el modelo.

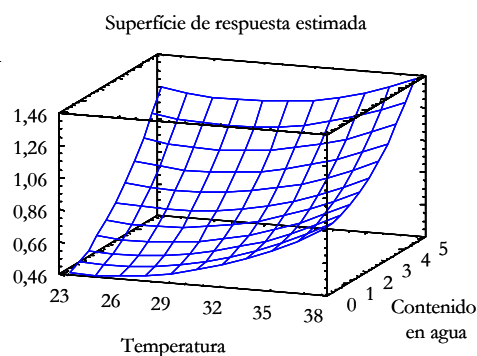


Fig. III-38.-Variable respuesta mg/mL disacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Superficie de respuesta para cada variable respuesta.

Las variables respuestas *D/M* y *T/M* se correlacionaron considerando una dependencia cuadrática de los factores (*W* y *T*). Los parámetros del modelo se estimaron por regresión lineal múltiple y se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\frac{D}{M} = 1.65453 - 0.09882 \cdot T + 0.11691 \cdot W + 0.00205 \cdot T^2 - 0.00297 \cdot T \cdot W + 0.02274 \cdot W^2$$

($R^2=0.893$) (Ecuación III-6)

$$\frac{T}{M} = 0.70605 - 0.05313 \cdot T + 0.03423 \cdot W + 0.00097 \cdot T^2 - 0.00064 \cdot T \cdot W + 0.02280 \cdot W^2$$

($R^2=0.906$) (Ecuación III-7)

Con el objetivo de minimizar la extracción de disacáridos y carbohidratos de mayor grado de polimerización, se aplicó un proceso iterativo para encontrar los factores que

simultáneamente minimizaban las ecuaciones aplicadas; se obtuvieron como valores óptimos un contenido de agua del 2.4 % y un rango de temperaturas entre 25 y 30 °C. Por lo tanto, se diseñó un proceso de extracción con SCCO₂ en dos etapas, la primera, en la que se favorecería la extracción de monosacáridos y la segunda en la que se extraerían los disacáridos, mientras los trisacáridos y carbohidratos de mayor grado de polimerización permanecerían sin extraer en la celda de extracción. De esta manera era de esperar que se obtuviera un producto altamente enriquecido en GOS.

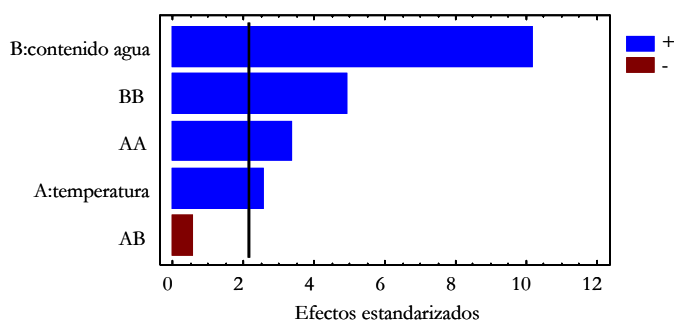


Fig. III-39.-Variable respuesta mg/mL trisacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Diagrama de Pareto con el efecto de cada término en el modelo.

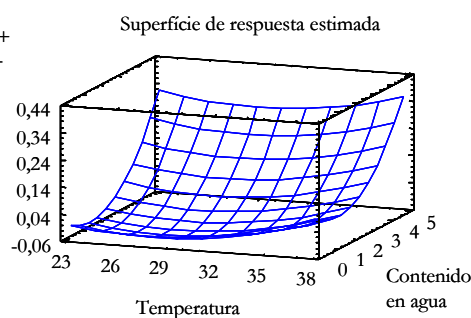


Fig. III-40.-Variable respuesta mg/mL trisacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Superficie de respuesta para cada variable respuesta.

3.4.1.2. Extracción de la mezcla comercial de GOS por tecnología de fluidos supercríticos empleando SCCO₂ y etanol/agua como modificador

3.4.1.2.1. Mezcla etanol/agua 97.6/2.4 % (v/v) como modificador

Considerando las diferencias en el peso molecular entre monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y tetrasacáridos se puede esperar que la solubilidad de los carbohidratos en SCCO₂ disminuya cuando el peso molecular aumenta. Además, los estudios preliminares realizados sobre la solubilidad de la mezcla comercial de GOS en etanol/agua indicaban un máximo para la selectividad de los monosacáridos respecto a los disacáridos y carbohidratos de mayor grado de polimerización si el contenido de agua en la mezcla etanol/agua era de 2.4 %. Aunque el empleo de etanol puro como modificador puede producir mayor selectividad, nuestros estudios previos (27, 28) demuestran que la adición de pequeñas cantidades de agua puede aumentar de forma importante el rendimiento de la extracción. Por lo tanto, para los experimentos con extracción supercrítica se empleó, en un primer momento, una mezcla etanol/agua 97.6:2.4 v/v como modificador.

La Tabla III-19 muestra los resultados obtenidos con la extracción con fluidos supercríticos de 200 mg de muestra de la mezcla comercial de GOS usando 1.2 g/min de flujo de CO₂ y las diferentes condiciones de extracción (temperatura, presión, cantidad de modificador y matriz inerte para dispersar la mezcla de carbohidratos). Como se ha comentado, se empleó un proceso de extracción en dos etapas para fraccionar la mezcla comercial de GOS (ver Tabla III-19). Las condiciones de extracción se eligieron para cada etapa de acuerdo a los resultados de los trabajos previos (184, 185) y a algunos experimentos preliminares que se llevaron a cabo para favorecer la extracción de monosacáridos (paso 1 de la Tabla III-19) y disacáridos (paso 2 de la Tabla III-19). Los cromatogramas de las extracciones 1 y 3 se muestran en la Figura III-41.

Tabla III-19. Extracción supercrítica de la mezcla comercial de GOS (CGOS) usando CO₂ + Etanol/Agua 97.6:2.4 (v/v) como modificador. M: monosacáridos; D: disacáridos; T: trisacáridos y tetrasacáridos. P: presión extracción; T: temperatura extracción; FM: flujo modificador.

Condiciones supercríticas P(bar) / T(°C) / FM (mLmin ⁻¹)			CGOS (mg)	matriz	% extraído (rendimiento)			Composición del extracto (% peso)		
Ext	Paso				M	D	T	M	D	T
1	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	208.6	Arena mar	17.48	3.23	0.00	65.34	34.66	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			25.85	31.57	7.30	20.24	70.96	8.80
2	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	199.6	Arena mar	23.83	2.88	0.00	74.22	25.78	0.00
	2	100/100/0.6 (3-6 horas)			37.00	14.49	20.89	33.42	37.56	29.02
3	1	150/100/0.6 (0-3 horas)	202.0	Arena mar	67.55	38.16	0.00	38.16	61.84	0.00
	2	100/100/0.6 (3-6 horas)			34.63	13.56	21.06	32.69	36.73	30.58
4	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	203.4	Arena mar	19.45	4.71	0.00	59.00	41.00	0.00
	2	100/80/0.6 (3-6 horas)			12.93	4.81	0.00	48.35	51.65	0.00
5	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	211.3	Arena mar	16.64	3.00	0.00	65.89	34.11	0.00
	2	100/80/0.4 (3-6 horas)			7.72	2.49	0.00	51.90	48.10	0.00
6	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	206.7	Anillos Fenske	19.35	3.73	0.00	64.39	35.61	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			39.97	27.26	19.64	26.93	52.71	20.36
7	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	204.9	Perlas cristal	20.98	2.99	0.00	70.94	29.06	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			15.68	7.79	0.00	41.21	58.79	0.00
8	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	205.2	Sin matriz	22.78	5.27	0.00	60.10	39.90	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			52.63	43.50	19.46	25.38	60.19	14.43

Analizando los resultados de la Tabla III-19 se puede observar que la primera extracción (realizada a 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min de modificador (etanol/agua 97.6:2.4 v/v)) produce extractos con un incremento tres veces mayor de la concentración de monosacáridos, esto es, extractos que contienen un 60-70 % de monosacáridos comparado con el 18.4 % de la mezcla original. Los cromatogramas de los experimentos se muestran en la Figura III-41. Sin embargo, la cantidad de monosacárido extraídos es muy baja (alrededor del 20 % de monosacáridos presentes en la mezcla) y por eso no es posible purificar los disacáridos en el segundo paso. También se observa, de las extracciones 1, 6, 7 y 8 de la Tabla III-19 (llevadas a cabo exactamente en las mismas condiciones), que el tipo de matriz empleada para dispersar la mezcla de carbohidratos influye en la extracción de monosacáridos. Además, si aumentamos la temperatura de extracción de 80 a 100 °C (extracción 3) se produce un incremento en el rendimiento de la extracción de monosacáridos (del 20 % al 67 %), pero a la vez disminuye considerablemente el contenido porcentual de monosacáridos en el extracto.

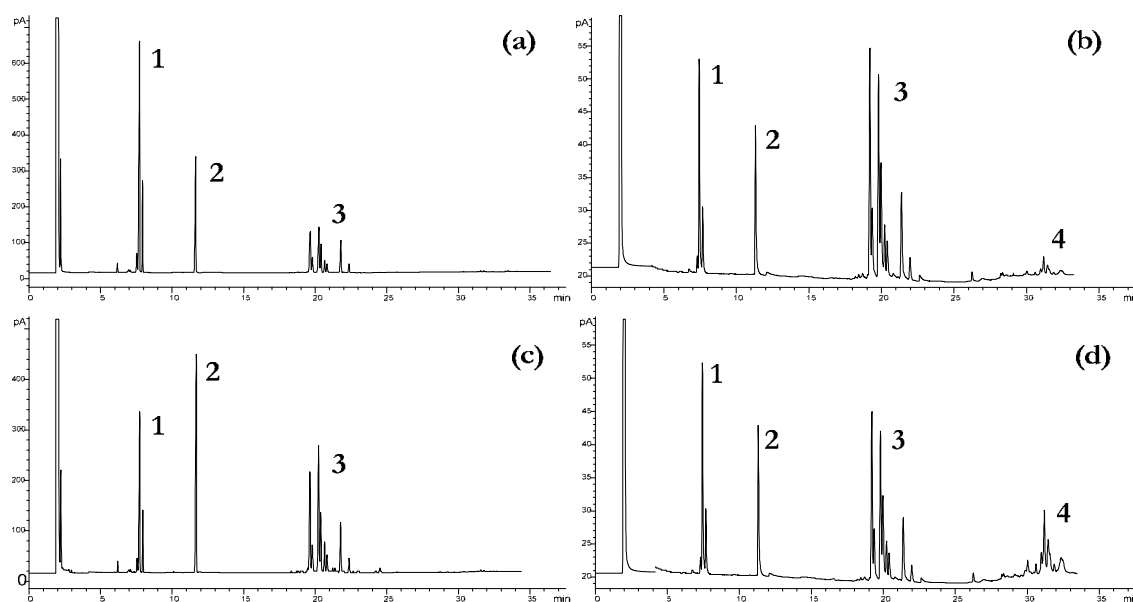


Fig. III-41.- (a) Cromatograma experimento 1 paso 1 ; (b) Cromatograma experimento 1 paso 2; (c) Cromatograma experimento 3 paso 1 ; (d) Cromatograma experimento 3 paso 2; 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.

Como se ha mencionado previamente, aumentando el contenido en agua de la mezcla etanol/agua (de 2.4 % a 5 %), aumentaba considerablemente el rendimiento de la extracción sin que se apreciara una reducción ostensible de la selectividad. Por eso, para aumentar el rendimiento de la extracción de monosacáridos, se aumentó el contenido en agua del modificador (etanol/agua) hasta un 5 % (justo en el límite de cambio de comportamiento de la solubilidad de los diferentes carbohidratos, tal como se muestra en la Figura III-35).

3.4.1.2.2. Mezcla etanol/agua 95/5 % (v/v) como modificador

La Tabla III-20 muestra los resultados obtenidos para los diferentes procesos de extracción supercrítica en dos etapas empleando como modificador etanol/agua 95:5 v/v. En la primera etapa de fraccionamiento (considerando 200 mg de mezcla comercial de GOS y 1.2 g/min de flujo de CO₂) se obtuvo un extracto con el 68 % de monosacáridos y un 100 % de rendimiento (Extracción 1 de la Tabla III-20; Figura III-45). Esto es, los monosacáridos se extrajeron completamente cuando el contenido de agua aumentó de 2.4 % a 5 %, mientras que la selectividad se mantuvo casi constante. En el segundo paso de la extracción 1 (100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min de flujo de modificador), se obtuvo un extracto que contenía un 89 % de disacáridos con un rendimiento del 65 %.

Tabla III-20. Extracción supercrítica de la mezcla comercial de GOS (CGOS) usando CO₂ + Etanol/Agua 95:5 (v/v) como modificador. M: monosacáridos; D: disacáridos; T: trisacáridos y tetrasacáridos. P: presión extracción; T: temperatura extracción; FM: flujo modificador.

Condiciones supercríticas			CGOS (mg)	matriz	% extraído (rendimiento)			Composición del extracto (% peso)		
P(bar) / T(°C) / FM (mLmin ⁻¹)					M	D	T	M	D	T
Ext	Paso									
1	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	208.0	Arena mar	100.4	16.99	0.00	67.97	32.03	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			6.8	65.1	5.69	6.59	89.23	4.18
2	1 ^a	150/80/0.6 (0-3 horas)	214.1	Arena mar	68.50	5.73	0.00	80.64	19.36	0.00
	2 ^a	100/100/0.4 (3-6 horas)			31.97	61.45	28.36	12.69	70.00	17.31
3	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	500.6	Arena mar	27.87	12.52	0.00	43.68	56.32	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			41.74	41.72	15.00	22.62	64.88	12.50
4	1 ^b	150/80/0.6 (0-3 horas)	502.3	Arena mar	55.78	16.62	0.00	53.89	46.11	0.00
5	1 ^c	150/80/0.6 (0-3 horas)	499.5	Arena mar	41.95	12.20	0.00	54.52	45.48	0.00
	2 ^c	100/100/0.4 (3-6 horas)			49.90	32.94	2.39	33.69	63.82	2.48
6	1 ^c	150/80/0.6 (0-3 horas)	499.8	Arena mar	39.67	10.04	0.00	57.92	42.08	0.00
	2 ^c	100/100/0.6 (3-6 horas)			64.59	89.52	21.06	18.25	72.59	9.15
7	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	992.8	Arena mar	67.52	24.07	2.48	48.08	49.20	2.72
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			12.73	23.25	11.80	13.04	68.36	18.60
8	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	997.0	Anillos Fenske	17.93	2.72	0.36	68.23	29.66	2.12
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			21.77	15.68	6.67	28.27	58.42	13.31
9	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	993.4	Perlas cristal	19.61	3.57	0.00	65.68	34.32	0.00
	2	100/100/0.4 (3-6 horas)			20.53	15.45	5.23	28.17	60.80	11.03
10	1	150/80/0.6 (0-3 horas)	1012.1	Sin	20.91	7.87	0.00	48.08	51.92	0.00

	2	100/100/0.4 (3-6 hours)		matriz	24.10	19.88	3.33	27.93	66.13	5.94
11	1 ^d	150/80/0.6 (0-3 horas)	99.5	Arena	8.67	1.51	0.00	66.61	33.39	0.00
	2 ^d	100/100/0.4 (3-6 horas)		mar	7.07	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00

^a 1.8 g/min CO₂; ^b 0.6 g/min CO₂; ^c ratio carbohidrato/matriz 1:20; ^d isopropanol como modificador.

Se realizaron también experimentos adicionales aumentando (extracción 2; Figura III-42) o disminuyendo (extracciones 3 y 4) la relación entre el flujo de CO₂ y la cantidad de mezcla de carbohidratos en la celda (F/C). Se produjo un descenso del rendimiento de la extracción de monosacáridos tanto si se aumentaba como si se disminuía el flujo de CO₂. Por lo tanto se puede concluir que una relación F/C adecuada (por ejemplo 1.2 g/min de CO₂ y 200 mg de mezcla de carbohidratos) es muy importante a la hora de obtener buenos rendimientos de extracción (extracción 1 de la Tabla III-20).

La cantidad de muestra en la celda de extracción se aumentó en las extracciones 5 y 6, pero usando una relación carbohidrato/matriz 1:20. No obstante, incluso aumentando la dispersión de los carbohidratos, los monosacáridos no se extrajeron completamente en estos experimentos.

Las extracciones 7 a 10 muestran el efecto de diferentes matrices en el proceso de extracción. En estos casos se observó una diferencia significativa entre la arena de mar y el resto de matrices. Los anillos Fenske y las perlas de cristal produjeron el mismo resultado que cuando no había matriz; la arena del mar produjo un rendimiento elevado para los monosacáridos, pero no llegó al 100 %, debido a la relación F/C tan baja empleada (1.2 g/min por 1000 mg de mezcla de carbohidratos).

Se llevaron a cabo experimentos adicionales empleando isopropanol como modificador (extracción 11, Tabla III-20) intentando una extracción más selectiva de los monosacáridos. Como se esperaba, se obtuvieron extractos de composición similar a cuando se utilizó etanol/agua como modificador, sin embargo el rendimiento de la extracción fue muy bajo (<9 %).

En resumen, se puede decir que se consiguió el fraccionamiento de una mezcla comercial de GOS por sus pesos moleculares usando un proceso de extracción supercrítica en dos etapas como el que aparece en la extracción 1 de la Tabla III-20. En la primera etapa se obtuvo un extracto con un contenido en monosacáridos del 68 % equivalente a la totalidad de los monosacáridos de la muestra inicial, mientras que la segunda etapa produjo un extracto con un contenido en disacáridos del 89 % equivalente al 65 % de los disacáridos presentes en la muestra inicial. Por otro lado, el material no extraído y que permanecía en la celda de extracción contenía el 94 % de los trisacáridos y tetrasacáridos iniciales con un contenido del 74 % (Figura III-42 (e) y (f)). En términos de selectividad entre monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, en las condiciones supercríticas probadas,

no hubo extracción preferencial de las cetosas, dando para todas las condiciones una relación similar.

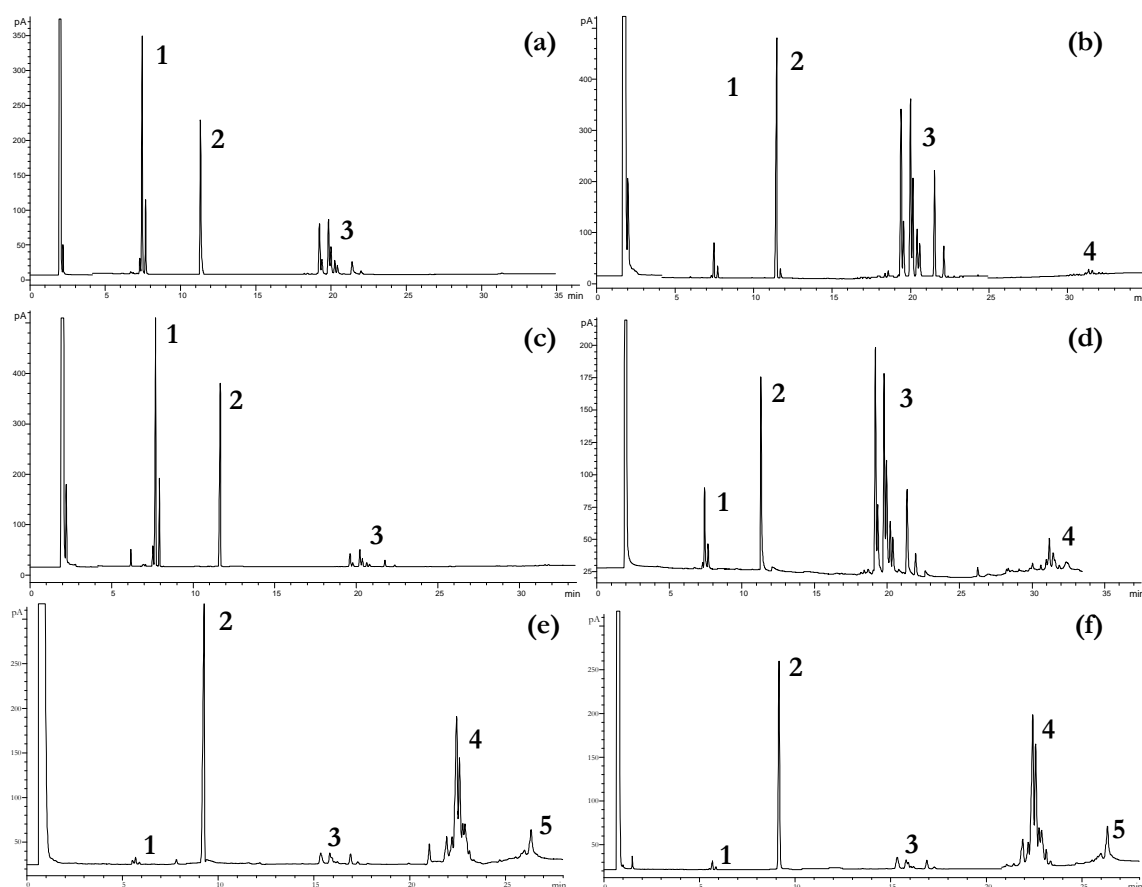


Fig. III-42.-**(a)** Cromatograma experimento 1 paso 1 ; **(b)** Cromatograma experimento 1 paso 2; **(c)** Cromatograma experimento 2 paso 1; **(d)** Cromatograma experimento 2 paso 2; **(e)** Cromatograma experimento 1 residuo; **(f)** Cromatograma experimento 2 residuo; **1.** Monosacáridos; **2.** Patrón interno (β -fenil-glucósido); **3.** Disacáridos; **4.** Trisacáridos; **5.** Tetrasacáridos.

3.4.2. Conclusiones

En este apartado se presenta por primera vez el fraccionamiento de GOS prebióticos a partir de una mezcla de carbohidratos disponible comercialmente usando tecnología de fluidos supercríticos y una mezcla de etanol/agua como modificador. Las condiciones de extracción (presión, temperatura y flujo del modificador), que coinciden con las optimizadas en capítulos anteriores (184, 185, 256), han mostrado que es posible el aislamiento de monosacáridos, disacáridos y carbohidratos de mayor peso molecular a partir de una mezcla compleja de carbohidratos, con rendimiento y pureza satisfactorios. Además, se ha demostrado la capacidad de la tecnología de fluidos supercríticos como alternativa verde para producir GOS prebióticos, ya que es posible separar los carbohidratos según su peso molecular.

Asímismo, de los diferentes valores de solubilidad a presión atmosférica del Vivinal GOS[®] obtenidos según la composición del disolvente empleado se deduce que este método puede emplearse para la purificación de oligosacáridos mediante extracción con etanol:agua para contenidos de agua entre el 1 y 4% (en volumen).

3.5. Fraccionamiento de mezclas complejas de carbohidratos prebióticos en condiciones supercríticas producidas por transglicosilación enzimática e isomerizadas con aluminatos o boratos

El objetivo de este apartado fue el fraccionamiento, en función de su peso molecular, de mezclas complejas de carbohidratos prebióticos empleando la tecnología de fluidos supercríticos. Las mezclas de carbohidratos se obtuvieron mediante transglicosilación enzimática a partir de lactosa y posterior isomerización con aluminatos o boratos. Un aspecto clave para el desarrollo de este proceso era la recuperación de los carbohidratos con una mínima contaminación de boratos o aluminatos, necesarios para llevar a cabo la reacción de isomerización; en este sentido se pretendió obtener extractos con un contenido en boratos o aluminatos por debajo de los límites recomendados para su uso alimentario. Como se ha mencionado en la introducción de esta memoria, la utilización de estos catalizadores no es del todo satisfactoria a nivel industrial debido a la dificultad de eliminar el aluminato y el borato que encarece el proceso.

Para la consecución de este objetivo se diseñó el plan de trabajo que aparece en la Figura III-43.

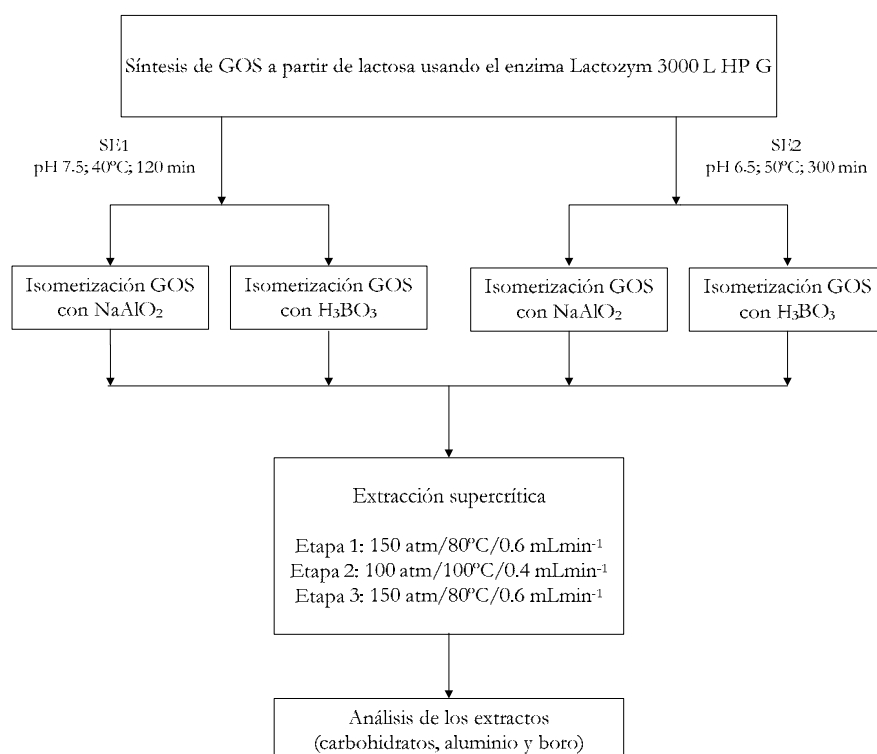


Fig. III-43.-Diagrama de flujo del proceso.

3.5.1. Resultados y Discusión

3.5.1.1. Síntesis enzimática de GOS

La síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa se llevó a cabo con Lactozym 3000 L HP G empleando dos condiciones diferentes. El objetivo de usar dos condiciones diferentes era obtener mezclas de GOS con diferente composición para estudiar su influencia en la posterior extracción supercrítica.

Como puede observarse, después de la síntesis, las muestras que contenían mayoritariamente GOS, lactosa sin reaccionar y pequeñas cantidades de galactosa y glucosa (223) se isomerizaron usando aluminato sódico o ácido bórico como catalizadores. Como se ha mencionado, este paso es obligatorio para obtener cetosas, y por lo tanto, la forma prebiótica de los carbohidratos reductores.

La Tabla III-21 muestra los resultados obtenidos en la síntesis de GOS a partir de la lactosa bajo las condiciones que aparecen en la Figura III-43. Los resultados concuerdan con los resultados previos obtenidos por otros autores (222) usando el mismo sistema de reacción.

Tabla III-21. Síntesis de GOS a partir de lactosa usando el enzima Lactozym 3000 L HP G.

Síntesis enzimática GOS	Tiempo reacción (minutos)	Lactosa usada (g)	pH	Temperatura (°C)	Composición producto (peso %)		
					% M	% D	% T
SE1	120	60	7.5	40	36.88	47.12	16.00
SE2	300	60	6.5	50	61.19	25.94	12.87

SE: Síntesis enzimática; % M: % monosacáridos; % D: % disacáridos; % T: % trisacáridos (en peso)

La síntesis de GOS a partir de lactosa empleando Lactozym 3000 L HP G da lugar a importantes cantidades de glucosa y galactosa, así como a una cantidad considerable de lactosa sin reaccionar. Estos carbohidratos no tienen carácter prebiótico, ya que son absorbidos por el intestino delgado (aumentando de ese modo el valor calórico del producto). Por este motivo, la mezcla resultante se isomeriza posteriormente empleando aluminato sódico o ácido bórico lo que conduce a una cierta transformación (dependiendo de las condiciones) de lactosa, glucosa y galactosa en lactulosa, fructosa y tagatosa, respectivamente.

3.5.1.2. Isomerización de GOS sintetizados enzimáticamente con aluminato sódico o ácido bórico

Además de las isomerizaciones esperadas en los productos mayoritarios, la alolactosa, la 6 galactobiosa y la 6' galactosil lactosa se isomerizan también a sus correspondientes

cetosas. Mediante la reacción de isomerización es posible aumentar las propiedades prebióticas de la mezcla inicial de GOS debido a que la tagatosa y la lactulosa también son considerados carbohidratos prebióticos y esta mezcla puede ser empleada en un mayor número de productos funcionales y suplementos dietéticos.

Los resultados de las isomerizaciones aparecen resumidos en la Tabla III-22, donde solamente se muestran aquellos experimentos que producen mayor cantidad de trisacáridos isomerizados (GOS). Como se ha explicado en el apartado 3.1.2. de materiales y métodos, se llevaron a cabo isomerizaciones con aluminato sódico y ácido bórico de las síntesis SE1 y SE2 de la Tabla III-21. Se emplearon relaciones molares 1:1 y 2:1 de agente complejante/carbohidrato. Para los experimentos en que se usó aluminato sódico como agente complejante se tomaron muestras a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas (ver resultados en la Tabla VI-1 del Anexo 6.3). Para los experimentos en que se usó ácido bórico como agente complejante se tomaron muestras a los 60, 90, 120, 150 y 180 minutos (ver resultados en la Tabla VI-1 del Anexo 6.3). En la Figura III-44 se presentan algunos ejemplos de los cromatogramas obtenidos en el análisis de las mezclas.

Después de la isomerización y antes de la extracción supercrítica, los aluminatos y los boratos se precipitaron con ácido sulfúrico en algunas muestras, mientras que en otras no se precipitaron, para con objeto de conocer su posible influencia en la posterior extracción supercrítica.

Tabla III-22. Isomerización de GOS con aluminato sódico y ácido bórico

Síntesis GOS	Relación molar aluminato sódico/carbohidrato	Tiempo isomerización GOS	Total carbohidratos (%)	%M totales	%M N Is	%M Is	%D totales	%La	%Lu	%Otros D N Is	%Otros D Is	%T totales	%T N Is	%T Is
Composición después síntesis enzimática GOS				36.88	36.88	0.00	47.12	21.36	0.00	25.76	0.00	16.00	16.00	0.00
SE1	1:1	8 horas	84.2	35.91	18.21	17.70	45.23	2.39	18.94	15.62	8.28	18.86	13.72	5.14
SE1	2:1	8 horas	87.7	28.74	9.56	19.18	53.07	2.80	22.22	18.31	9.74	18.19	11.71	6.48
Composición después síntesis enzimática GOS				61.19	61.19	0.00	25.94	12.19	0.00	13.75	0.00	12.87	12.87	0.00
SE2	1:1	8 horas	86	57.70	33.44	24.26	24.77	3.10	8.68	4.88	8.11	17.53	12.55	4.98
SE2	2:1	8 horas	88.4	50.64	23.92	26.72	32.78	3.33	12.06	7.07	10.33	16.58	10.81	5.77
Síntesis GOS	Relación molar ácido bórico/carbohidrato	Tiempo isomerización GOS	Total carbohidratos (%)	%M totales	%M N Is	%M Is	%D totales	%La	%Lu	%Otros D N Is	%Otros D Is	%T totales	%T N Is	%T Is
Composición después síntesis enzimática GOS				36.88	36.88	0.00	47.12	21.36	0.00	25.76	0.00	16.00	16.00	0.00
SE1	1:1	150 minutos	81.2	38.67	20.78	17.89	43.35	3.02	17.56	14.82	7.94	17.98	12.36	5.62
SE1	2:1	150 minutos	83.3	34.30	15.98	18.32	46.24	2.74	18.89	14.17	10.44	19.46	12.80	6.66
Composición después síntesis enzimática GOS				61.19	61.19	0.00	25.94	12.19	0.00	13.75	0.00	12.87	12.87	0.00
SE2	1:1	150 minutos	83.9	55.90	34.32	21.58	28.09	3.83	10.73	6.60	6.93	16.01	10.78	5.23
SE2	2:1	150 minutos	84.6	51.14	26.82	24.32	33.03	2.26	13.03	6.71	11.03	15.83	9.69	6.14

Total carbohidratos (%): % de carbohidratos presentes en la mezcla en relación con los carbohidratos iniciales.

M: monosacáridos; D: disacáridos; T: trisacáridos; La: lactosa; Lu: lactulosa.

Is: isomerizados; N Is: no isomerizados

SE1 y SE2: reacción de síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (ver Tabla III-21)

La Tabla III-22 muestra que el porcentaje de isomerización es similar usando el aluminato sódico o el ácido bórico. Considerando las mismas condiciones de síntesis de GOS, los porcentajes de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos isomerizados son muy similares, siendo ligeramente superiores cuando el ratio agente complejante/carbohidratos es 2:1.

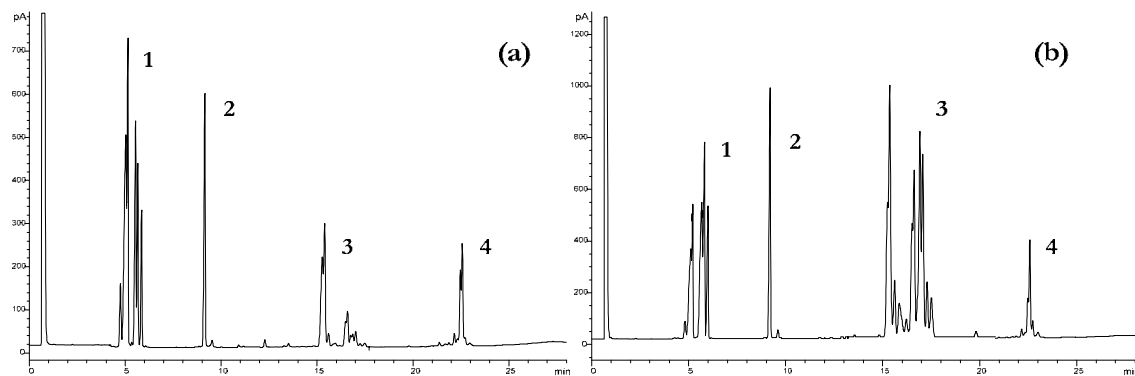


Fig. III-44.-Cromatogramas de los experimentos **(a)** SE1 1:1 8 horas isomerización de GOS con aluminato sódico; **(b)** SE2 2:1 8 horas isomerización de GOS con ácido bórico. **1.** Monosacáridos; **2.** Patrón interno (β -fenil-glucósido); **3.** Disacáridos; **4.** Trisacáridos.

3.5.1.3. Extracción supercrítica de mezclas complejas de carbohidratos con aluminato sódico

Después de la isomerización de los GOS, todas las muestras se trataron con SCCO_2 y diferentes mezclas etanol/agua como modificador. Al ser nuestro objetivo el fraccionamiento completo de la mezcla compleja de carbohidratos según su grado de polimerización, se diseñó un proceso de extracción supercrítica en tres etapas para extraer monosacáridos, disacáridos y trisacáridos respectivamente (257): 150 bar/80 °C/0.6 mLmin^{-1} de modificador para la primera etapa y 100 bar/100 °C/0.4 mLmin^{-1} de modificador en la segunda etapa. Ambas etapas duraron 3 horas y se empleó etanol/agua 95:5 (v/v) como modificador.

Con estos dos pasos se esperaba eliminar la mayoría de monosacáridos (primera etapa) y la mayoría de disacáridos (segunda etapa), dejando la mayoría de trisacáridos (con elevada pureza) en la celda de extracción. La extracción de trisacáridos se optimizó usando la muestra y las condiciones experimentales que proporcionaron mejor extracción de monosacáridos y disacáridos. Para conseguir una óptima extracción de trisacáridos se varió la composición del modificador según estudios previos realizados en nuestro laboratorio (257).

La Tabla III-23 resume los resultados obtenidos en los experimentos para eliminar monosacáridos y disacáridos de la mezcla compleja de carbohidratos isomerizada con

aluminato sódico. La última columna muestra los mg Al/Kg de carbohidrato en la muestra extraída.

Tabla III-23. Extracción supercrítica de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos presentes en mezclas de GOS isomerizados con aluminatos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas).

Muestra	Condiciones enzimáticas e isomerización		% M mezcla	% D mezcla	% T mezcla	% M extraído	% D extraído	% T extraído	mg Al / kg carb.
S1	SE1 RM=1:1 P	Composición muestra	35.91	45.23	18.86				161.90
		Extracto 1ª etapa	95.18	4.82	0.00	92.10	3.70	0.00	6.51
		Extracto 2ª etapa	71.50	28.50	0.00	7.90	2.50	0.00	12.40
		Total extraído				100.00	6.20	0.00	
S2	SE1 RM=2:1 P	Composición muestra	28.74	53.07	18.19				59.82
		Extracto 1ª etapa	95.49	4.51	0.00	86.09	2.20	0.00	2.12
		Extracto 2ª etapa	24.13	75.87	0.00	13.10	22.30	0.00	0.08
		Total extraído				99.19	24.50	0.00	
S3	SE2 RM=1:1 P	Composición muestra	57.70	24.77	17.53				211.39
		Extracto 1ª etapa	98.89	1.11	0.00	79.11	2.07	0.00	9.11
		Extracto 2ª etapa	40.03	59.97	0.00	21.26	74.19	0.00	3.55
		Total extraído				100.37	76.26	0.00	
S4	SE2 RM=2:1 P	Composición muestra	50.93	32.11	16.96				78.95
		Extracto 1ª etapa	92.96	7.04	0.00	86.22	10.36	0.00	13.96
		Extracto 2ª etapa	19.92	80.08	0.00	13.01	82.95	0.00	0.09
		Total extraído				99.23	93.31	0.00	
S5	SE1 RM=1:1 NP	Composición muestra	35.91	45.23	18.86				56475
		Extracto 1ª etapa	100.00	0.00	0.00	50.02	0.00	0.00	47.98
		Extracto 2ª etapa	100.00	0.00	0.00	52.09	0.00	0.00	8.56
		Total extraído				102.11	0.00	0.00	

SE1 y SE2: síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (Tabla III-21).

RM: relación molar aluminato/carbohidrato usada en la reacción de isomerización.

P=aluminatos precipitados con ácido sulfúrico; NP=aluminatos sin precipitar.

Primera etapa extracción (0-3 horas): 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

Segunda etapa extracción (3-6 horas): 100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

carb.=carbohidrato.

Composición muestra=200 mg carbohidratos/900 mg arena de mar

M=monosacáridos; D=disacáridos; T=trisacáridos

Como se puede observar, en la extracción supercrítica de los GOS isomerizados con aluminatos se consigue una eliminación total de monosacáridos en todas las condiciones experimentales. La extracción completa de disacáridos se consiguió casi en su totalidad para muestras obtenidas a tiempos de reacción de isomerización de 300 minutos. Además, en todos los experimentos, la concentración de aluminio en los extractos se encontró por debajo de los límites de seguridad para los consumidores. Aunque no existe una legislación específica en la Unión Europea en relación a los límites máximos de boro y aluminio en alimentos, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha publicado varias opiniones y comunicados sobre el consumo de boro y aluminio. Para el aluminio, la comisión de expertos estableció 1 mg aluminio/Kg de peso corporal a la semana para un adulto, basado en el consumo total semanal. La mayoría de alimentos frescos y sin tratamiento contienen menos de 5 mg de aluminio/Kg. Concentraciones más elevadas (5 a 10 mg/Kg) se encuentran a menudo en algunos vegetales, repostería o productos lácteos. Alimentos con mayor concentración de aluminio son las hojas de té, el cacao y productos derivados del cacao, especias o plantas medicinales. De acuerdo con los resultados de la Tabla III-23, la cantidad de aluminio extraído junto con los carbohidratos varía entre el 0.1 y los 14 mg/Kg de carbohidratos.

Es interesante remarcar que cuando los aluminatos no se precipitan después de la isomerización de los GOS (muestra S5 de la Tabla III-23), sólo se eliminan los monosacáridos. Este hecho podría deberse a las interacciones entre los agentes complejantes y los carbohidratos con mayor grado de polimerización que hacen que los complejos disacáridos-aluminato y trisacáridos-aluminato sean menos solubles bajo esas condiciones experimentales.

Para llevar a cabo el tercer paso, la extracción de trisacáridos, el experimento elegido fue el S4. Esta muestra corresponde a la mezcla de GOS obtenida después de la síntesis enzimática SE2, seguida de 8 horas de isomerización con una relación molar 2:1 de aluminatos/carbohidrato seguida de una precipitación de los aluminatos con ácido sulfúrico.

Una vez elegidas las mejores condiciones para la extracción de monosacáridos y disacáridos, el siguiente paso que se llevó a cabo, previo a la extracción de trisacáridos, fue la optimización de la cantidad de carbohidratos y la de arena de mar presentes en la celda de extracción. En los experimentos que aparecen descritos en la Tabla III-23, la cantidad de carbohidratos en la celda de extracción fue de 200 mg. Dicha cantidad fue elegida según estudios anteriores (257). Los resultados obtenidos para diferentes cantidades de carbohidratos, que aparecen en la Tabla III-24 concuerdan con los resultados obtenidos en dichos estudios anteriores.

Tabla III-24. Extracción supercrítica de monosacáridos y disacáridos de los GOS isomerizados con aluminatos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de carbohidratos.

Muestra	Condiciones enzimáticas e isomerización		% M mezcla	% D mezcla	% T mezcla	% M extraído	% D extraído	% T extraído
S6	SE2 RM=2:1 P 300 mg carbohidratos	Composición muestra	50.93	32.11	16.96			
		Extracto 1ª etapa	91.42	8.58	0.00	58.04	8.64	0.00
		Extracto 2ª etapa	28.45	71.55	0.00	16.17	64.51	0.00
		Total extraído				74.21	73.16	0.00
S7	SE2 RM=2:1 P 400 mg carbohidratos	Composición muestra	50.93	32.11	16.96			
		Extracto 1ª etapa	94.46	5.54	0.00	45.23	4.21	0.00
		Extracto 2ª etapa	31.37	68.63	0.00	11.78	40.88	0.00
		Total extraído				57.01	45.09	0.00

SE1 y SE2: síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (Tabla III-21).

RM: relación molar aluminato/carbohidrato usada en la reacción de isomerización.

P=aluminatos precipitados con ácido sulfúrico.

Primera etapa extracción (0-3 horas): 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

Segunda etapa extracción (3-6 horas): 100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

carb.=carbohidrato.

M=monosacáridos; D=disacáridos; T=trisacáridos

Los resultados muestran que la cantidad óptima de muestra es 200 mg de carbohidratos. Para cantidades superiores la extracción de los carbohidratos no es total.

Para la optimización de la cantidad de arena se realizaron dos experimentos adicionales empleando las mismas condiciones pero diferentes cantidades de arena en la celda de extracción con objeto de evaluar su efecto en la extracción supercrítica (Tabla III-25). Los resultados demuestran que en las condiciones ensayadas y para contenidos superiores a 200 mg la proporción de arena mezclada con la muestra no tiene un efecto significativo en la extracción supercrítica. Además, se llevaron a cabo dos extracciones supercríticas (una extracción con 100 mg de arena y otra sin arena). Los resultados no aparecen en Tabla III-25 ya que no se pudieron completar las extracciones por problemas de sobrepresión y dificultad para mantener el flujo del fluido supercrítico debido a la obturación de la línea.

Tabla III-25. Extracción supercrítica de los GOS isomerizados con aluminatos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de arena.

Muestra	Condiciones enzimáticas e isomerización		% M mezcla	% D mezcla	% T mezcla	% M extraído	% D extraído	% T extraído
S8	SE2 RM=2:1 P 500 mg arena	Composición muestra	50.93	32.11	16.96			
		Extracto 1ª etapa	90.22	9.78	0.00	83.09	14.29	0.00
		Extracto 2ª etapa	19.16	80.84	0.00	12.21	81.72	0.00
		Total extraído				95.30	96.01	0.00
S9	SE2 RM=2:1 P 200 mg arena	Composición muestra	50.93	32.11	16.96			
		Extracto 1ª etapa	91.60	8.40	0.00	81.98	11.93	0.00
		Extracto 2ª etapa	21.04	78.96	0.00	13.76	81.91	0.00
		Total extraído				95.74	93.84	0.00

SE1 y SE2: síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (Tabla III-21).

RM: relación molar aluminato/carbohidrato usada en la reacción de isomerización.

P=aluminatos precipitados con ácido sulfúrico.

Primera etapa extracción (0-3 horas): 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

Segunda etapa extracción (3-6 horas): 100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

carb.=carbohidrato.

En apartados anteriores, se había demostrado que la solubilidad de los carbohidratos en CO₂ supercrítico con etanol/agua como modificador se podía aumentar mediante un incremento en el porcentaje de agua del modificador, aunque, por otro lado, se redujera la selectividad de la extracción. Debido a que los monosacáridos y los disacáridos se extraían completamente en dos etapas en las condiciones de la muestra S4 (ver Tabla III-23), los experimentos para extraer los trisacáridos se realizaron incrementando la cantidad de agua en la mezcla del modificador para, de esta forma, aumentar su solubilidad. Como el aumento del porcentaje de agua en el modificador conlleva una pérdida de selectividad, como ya se ha mencionado, se realizaron experimentos adicionales añadiendo ácido sulfúrico en el modificador. Añadiendo ácido sulfúrico se esperaban dos efectos: 1) la disminución de la solubilidad de los aluminatos en el fluido supercrítico, y 2) el aumento de la selectividad en el proceso de extracción de los trisacáridos.

El proceso en tres etapas se realizó empleando la muestra del experimento S4 manteniendo las condiciones detalladas en la Tabla III-23 para el primer y segundo paso y estableciendo unas condiciones de 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min de modificador para el tercer paso, pero variando el contenido de agua y ácido sulfúrico en la mezcla de modificador empleada en la tercera etapa de extracción. Los extractos obtenidos durante periodos regulares de tiempo (una hora) se recolectaron y analizaron para determinar la cantidad de aluminatos extraídos con los carbohidratos. Los resultados se muestran en la

Tabla III-26; en la Figura III-45 se presentan los cromatogramas de la primera, segunda y tercera etapa (con un 10% en volumen de agua en el modificador).

Tabla III-26. Extracción supercrítica en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con aluminatos (relación molar 2:1 aluminatos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 50.93% monosacáridos (M), 32.11% disacáridos (D) y 16.96% trisacáridos (T).

Etapa extracción / modificador empleado	Tiempo extracción	composición (% peso)			% M extraído	% D extraído	% T extraído	mg Al/Kg carb.
		% M	% D	%T				
1ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	0-3 h	92.96	7.04	0.00	86.22	10.36	0.00	13.96
2ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	3-6 h	19.92	80.08	0.00	13.01	82.95	0.00	0.09
total extraído 6 h					99.23	93.31	0.00	
Ensayos extracción 3ª etapa:								
3ª etapa / etanol:agua 92.5:7.5 v/v	6-7 h	5.08	59.53	35.38	0.23	4.35	4.89	66.92
	7-8 h	6.56	54.52	38.92	0.44	5.78	7.82	4.43
	8-9 h	3.90	43.70	52.40	0.03	0.56	1.27	3.22
total extraído 9 h					99.93	104.00	13.98	
3ª etapa / etanol:agua 90:10 v/v	6-7 h	5.20	16.40	78.40	0.81	4.07	36.80	10.08
	7-8 h	5.00	10.40	84.60	1.02	3.35	51.59	5.47
	8-9 h	3.00	0.00	97.00	0.07	0.00	6.37	18.99
	9-10 h	2.50	0.00	97.50	0.04	0.00	4.67	9.15
	10-11 h	1.80	0.00	98.20	0.01	0.00	2.21	12.52
Total extraído 11 h					101.18	100.73	101.63	
3ª etapa / etanol:agua 87.5:12.5 v/v	6-7 h	8.30	15.40	76.30	1.93	5.67	53.20	121.9
	7-8 h	5.50	10.80	83.70	1.07	3.34	48.98	32.15
	8-9 h	1.40	0.00	98.60	0.00	0.00	0.99	730.1
total extraído 9 h					102.23	102.32	103.17	
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9.9:0.1 v/v/v	6-7 h	3.60	6.60	89.80	0.44	1.27	32.76	8.79
	7-8 h	4.31	13.18	82.50	0.69	3.36	39.86	3.62
	8-9 h	2.52	6.63	90.85	0.10	0.41	10.69	4.19
	9-10 h	3.90	43.70	52.40	0.11	1.95	4.43	
Total extraído 10 h					100.57	100.30	87.74	
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9:1 v/v/v	6-7 h	2.30	7.40	90.30	0.15	0.77	17.72	7.85
	7-8 h	2.92	10.86	86.22	0.34	2.00	30.05	0.68
	8-9 h	2.70	7.10	90.20	0.11	0.45	10.93	1.24
	9-10 h	1.90	5.90	92.20	0.05	0.25	7.44	
Total extraído 10 h					99.88	96.78	66.13	

Como era de esperar, la extracción de trisacáridos con elevada pureza fue posible aumentando el contenido de agua en el modificador, consiguiendo similares concentraciones de aluminio que en los dos primeros pasos. Los experimentos con 10 y 12.5 % en volumen de agua, mostraron los mejores resultados para la extracción de trisacáridos (altas puridades y altos rendimientos) pero las cantidades de aluminio extraídas eran mayores en comparación con el aluminio extraído en las dos primeras etapas. Para disminuir la extracción de aluminio se añadió al modificador pequeños porcentajes de ácido sulfúrico (0.1 y 1 % volumen, respectivamente). El rendimiento de la extracción disminuyó

ligeramente mientras que la pureza fue mayor a la de los experimentos realizados con 10 y 12.5 % de agua en el modificador. Sin embargo, la cantidad de aluminio extraída era significativamente menor que cuando se usaba etanol/agua como modificador y similar a los valores obtenidos en la primera y segunda etapa de las extracciones. Los análisis realizados a las diferentes muestras de trisacáridos extraídas empleando un modificador con diferentes porcentajes de ácido sulfúrico revelaron que ninguna de esas muestras contenía ácido sulfúrico.

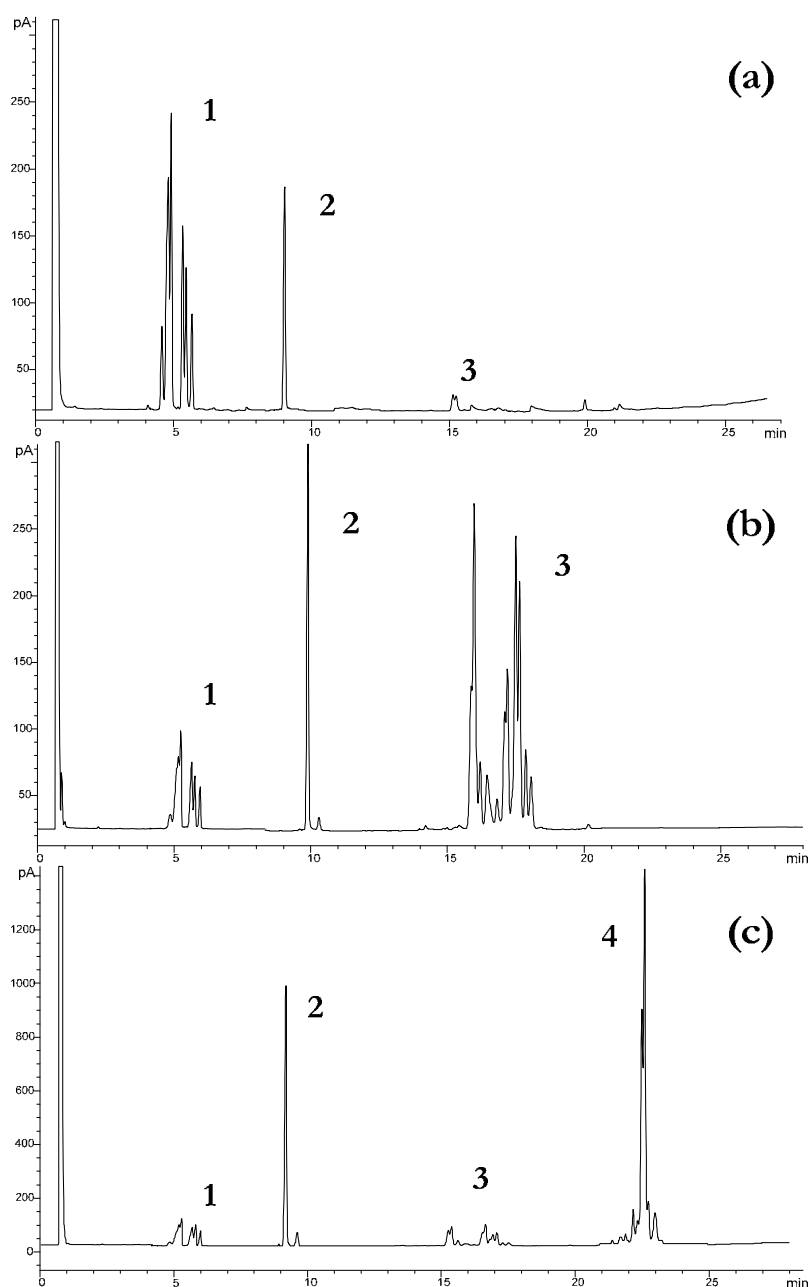


Fig. III-45.-Cromatogramas de los experimentos (a) 1ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (b) 2ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (c) 3ª etapa etanol/agua 90:10 v/v. 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.

En términos de selectividad entre monosacáridos, disacáridos y trisacáridos isomerizados y no isomerizados en las condiciones supercríticas probadas, no hubo extracción preferencial de las cetosas, dando para todas las condiciones una relación similar (Tabla III-27). Esto podría explicarse, ya que las condiciones seleccionadas para llevar a cabo el fraccionamiento se optimizaron para lograr la separación por peso molecular, más que por estructura del carbohidrato (257).

Tabla III-27. Relación aldosas/cetosas de las extracciones supercríticas en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con aluminatos (relación molar 2:1 aluminatos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 50.93% monosacáridos (M), 32.11% disacáridos (D) y 16.96% trisacáridos (T).

Etapa extracción / modificador empleado	Tiempo extracción	composición (% peso)			Ga/Ta	Glu/Fru	La/Lu	Otros DI N Is/ Otros DI Is	Tri N Is/Tri Is
		% M	% D	% T					
Inicial		50.93	32.11	16.96	1.05	0.55	0.24	0.67	1.79
1ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	0-3 h	92.96	7.04	0.00	1.03	0.54	0.27	0.70	
2ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	3-6 h	19.92	80.08	0.00	1.07	0.56	0.21	0.64	
Ensayos extracción 3ª etapa:									
3ª etapa / etanol:agua 92.5:7.5 v/v	6-7 h	5.08	59.53	35.38	1.11	0.61	0.27	0.68	1.78
	7-8 h	6.56	54.52	38.92	1.04	0.53	0.22	0.61	1.70
	8-9 h	3.90	43.70	52.40	1.00	0.51	0.23	0.72	1.68
3ª etapa / etanol:agua 90:10 v/v	6-7 h	5.20	16.40	78.40	1.04	0.60	0.28	0.62	1.82
	7-8 h	5.00	10.40	84.60	1.10	0.52	0.23	0.70	1.73
	8-9 h	3.00	0.00	97.00	1.03	0.54	0.22	0.65	1.77
	9-10 h	2.50	0.00	97.50	1.07	0.57	0.24	0.65	1.74
	10-11 h	1.80	0.00	98.20	1.01	0.52	0.23	0.73	1.89
3ª etapa / etanol:agua 87.5:12.5 v/v	6-7 h	8.30	15.40	76.30	1.09	0.52	0.23	0.66	1.83
	7-8 h	5.50	10.80	83.70	1.02	0.56	0.26	0.63	1.80
	8-9 h	1.40	0.00	98.60	1.04	0.57	0.23	0.72	1.74
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9.9:0.1 v/v/v	6-7 h	3.60	6.60	89.80	1.02	0.60	0.25	0.69	1.77
	7-8 h	4.31	13.18	82.50	1.07	0.53	0.21	0.68	1.73
	8-9 h	2.52	6.63	90.85	1.08	0.54	0.26	0.62	1.69
	9-10 h	3.90	43.70	52.40	1.03	0.53	0.24	0.69	1.61
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9:1 v/v/v	6-7 h	2.30	7.40	90.30	1.00	0.50	0.27	0.63	1.75
	7-8 h	2.92	10.86	86.22	1.04	0.55	0.22	0.66	1.78
	8-9 h	2.70	7.10	90.20	1.12	0.53	0.20	0.65	1.68
	9-10 h	1.90	5.90	92.20	1.04	0.62	0.27	0.74	1.71

Ga/Ta= relación galactosa/tagatosa

Glu/Fru= relación glucosa/fructosa

La/Lu= relación lactosa/lactulosa

Otros DI N Is/ Otros DI Is= relación entre otros disacáridos (diferentes a la lactosa y la lactulosa) no isomerizados y otros disacáridos isomerizados

Tri N Is/Tri Is= relación entre trisacáridos no isomerizados e isomerizados

3.5.1.4. Extracción supercrítica de mezclas complejas de carbohidratos con ácido bórico

Como se ha mencionado previamente, el ácido bórico también se ha empleado como agente complejante en la isomerización de los GOS. Las muestras tratadas con ácido bórico fueron sometidas a extracción supercrítica de la misma manera que lo habían sido los GOS isomerizados con aluminato sódico. Igualmente se trataba de eliminar monosacáridos (primera etapa) y disacáridos (segunda etapa). La Tabla III-28 resume los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones mencionadas previamente para los experimentos con aluminato sódico.

Tabla III-28. Extracción supercrítica de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos presentes en mezclas de GOS isomerizados con boratos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas).

Muestra	Condiciones enzimáticas e isomerización		% M mezcla	% D mezcla	% T mezcla	% M extraído	% D extraído	% T extraído	mg B / kg carb.
S1	SE1 RM=1:1 P	Composición muestra	38.67	43.35	17.98				511.98
		Extracto 1ª etapa	93.67	6.76	0.00	84.78	5.11	0.00	33.65
		Extracto 2ª etapa	37.10	62.90	0.00	15.53	23.49	0.00	5.91
		Total extraído				100.31	28.6	0.00	
S2	SE1 RM=2:1 P	Composición muestra	34.30	46.24	19.46				566.28
		Extracto 1ª etapa	94.99	5.01	0.00	74.79	3.40	0.00	39.79
		Extracto 2ª etapa	32.77	67.23	0.00	17.86	31.61	0.00	8.92
		Total extraído				92.65	35.01	0.00	
S3	SE2 RM=1:1 P	Composición muestra	55.90	28.09	16.01				408.04
		Extracto 1ª etapa	99.44	0.56	0.00	78.49	0.88	0.00	36.32
		Extracto 2ª etapa	33.56	66.44	0.00	18.36	72.32	0.00	0.05
		Total extraído				96.85	73.20	0.00	
S4	SE2 RM=2:1 P	Composición muestra	51.14	33.03	15.83				571.33
		Extracto 1ª etapa	90.30	9.70	0.00	84.61	14.07	0.00	13.98
		Extracto 2ª etapa	24.68	75.32	0.00	18.43	87.08	0.00	1.51
		Total extraído				103.03	101.15	0.00	
S5	SE1 RM=1:1 NP	Composición muestra	38.67	43.35	17.98				167508
		Extracto 1ª etapa	100.00	0.00	0.00	54.30	0.00	0.00	969.47
		Extracto 2ª etapa	100.00	0.00	0.00	41.66	0.00	0.00	86.32
		Total extraído				95.97	0.00	0.00	

SE1 y SE2: síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (Tabla III-21).

MR: relación molar borato/carbohidrato usada en la reacción de isomerización.

P=boratos precipitados con ácido sulfúrico; NP=boratos sin precipitar.

Primera etapa extracción (0-3 horas): 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

Segunda etapa extracción (3-6 horas): 100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

carb.=carbohidrato.

Composición muestra=200 mg carbohidratos/900 mg arena de mar

M=monosacáridos; D=disacáridos; T=trisacáridos

Durante la extracción supercrítica de los GOS isomerizados con boratos, la extracción completa de los monosacáridos se consiguió en todos los experimentos. Al igual que en los experimentos con aluminatos, la extracción completa de disacáridos se consiguió casi en su totalidad para tiempos de reacción de isomerización de 300 minutos (síntesis de GOS SE2). Además, en todos los experimentos la concentración de boro en el extracto se halló por debajo de los límites de seguridad para los consumidores. Como se ha mencionado para los aluminatos, no existe una legislación específica en la Unión Europea para los límites de boro en alimentos. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha publicado varias opiniones/comunicados sobre el boro. Los expertos han concluido que el límite máximo tolerable de consumo de boro es de 10 mg/día para adultos. Sin embargo, la US Food Nutrition Board establece un consumo máximo de 20 mg/día y la UK's Expert Working Group on Vitamins and Minerals (EVM) ha recomendado un consumo máximo de 6 mg/día (258). Durante las extracciones supercríticas de este estudio la cantidad de boro extraída junto a los carbohidratos variaba entre 0.05 y 40 mg boro/Kg de carbohidrato si los boratos eran eliminados de las mezclas de GOS por precipitación con ácido sulfúrico (muestras S1 a S4 de la Tabla III-28), previo a su extracción supercrítica.

Al igual que sucedía en los experimentos con aluminatos, cuando los boratos no se precipitaban después de la isomerización de los GOS (muestra S5 de la Tabla III-28), solamente se extraían, en la primera etapa, los monosacáridos mientras que los disacáridos permanecían en el residuo de la extracción, independientemente de las condiciones de extracción empleadas. Al igual que sucedía en el caso anterior, el complejo formado por los disacáridos-borato y trisacárido-borato debía ser lo suficientemente fuerte para evitar la disolución de los carbohidratos en el fluido supercrítico. Al igual que en el experimento con aluminatos, cuando los boratos no se precipitaban con ácido sulfúrico después de la reacción de isomerización de los GOS, la concentración de boro en las muestras extraídas era mayor que en las extracciones donde sí se precipitaban previamente los boratos (~80 mg B/Kg de carbohidrato extraído).

Como en los experimentos para los aluminatos, para llevar a cabo la extracción de trisacáridos (tercera etapa), se eligió el experimento S4. Previamente a la extracción de trisacáridos, y al igual que se hizo para las extracciones supercríticas de las muestras isomerizadas con aluminato sódico, el siguiente paso fue la optimización de la cantidad de carbohidratos y la de arena de mar presentes en la celda de extracción. En los experimentos

que aparecen descritos en la Tabla III-28, la cantidad de carbohidratos en la celda de extracción fue de 200 mg. Dicha cantidad se eligió teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente (257). Los resultados obtenidos para diferentes cantidades de carbohidratos, que aparecen en la Tabla III-29 concuerdan con los resultados hallados en esos estudios anteriores y con los resultados obtenidos en las extracciones supercríticas de muestras de GOS isomerizadas con aluminato sódico.

Tabla III-29. Extracción supercrítica de monosacáridos y disacáridos de los GOS isomerizados con boratos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de carbohidratos.

Muestra	Condiciones enzimáticas e isomerización		% M mezcla	% D mezcla	% T mezcla	% M extraído	% D extraído	% T extraído
S10	SE2 RM=2:1 P 300 mg carbohidratos	Composición muestra	52.02	32.41	15.57			
		Extracto 1ª etapa	88.55	11.45	0.00	50.92	10.57	0.00
		Extracto 2ª etapa	31.44	68.56	0.00	14.54	61.44	0.00
		Total extraído				65.46	61.44	0.00
S11	SE2 RM=2:1 P 400 mg carbohidratos	Composición muestra	52.02	32.42	15.57			
		Extracto 1ª etapa	90.75	9.25	0.00	40.39	6.61	0.00
		Extracto 2ª etapa	29.76	70.24	0.00	11.20	42.43	0.00
		Total extraído				51.59	45.09	0.00

SE1 y SE2: síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (Tabla III-21).

RM: relación molar borato/carbohidrato usada en la reacción de isomerización.

P=boratos precipitados con ácido sulfúrico.

Primera etapa extracción (0-3 horas): 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

Segunda etapa extracción (3-6 horas): 100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

carb.=carbohidrato.

M=monosacáridos; D=disacáridos; T=trisacáridos

Para la optimización de la cantidad de arena se realizaron dos experimentos adicionales en las mismas condiciones de extracción con diferentes cantidades de arena en la celda de extracción, para estudiar si la cantidad de arena tenía influencia en la extracción supercrítica (Tabla III-30). Al igual que en el caso anterior, los resultados demuestran que en las condiciones ensayadas la relación arena:muestra no tiene efecto en la extracción supercrítica.

Tabla III-30. Extracción supercrítica de los GOS isomerizados con boratos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de arena.

Muestra	Condiciones enzimáticas e isomerización		% M mezcla	% D mezcla	% T mezcla	% M extraído	% D extraído	% T extraído
S12	SE2 RM=2:1 P 500 mg arena	Composición muestra	52.02	32.41	15.57			
		Extracto 1ª etapa	91.34	8.66	0.00	80.31	12.22	0.00
		Extracto 2ª etapa	20.87	79.13	0.00	13.98	85.09	0.00
		Total extraído				94.29	97.31	0.00
S13	SE2 RM=2:1 P 200 mg arena	Composición muestra	52.02	32.42	15.57			
		Extracto 1ª etapa	91.21	8.79	0.00	83.38	12.90	0.00
		Extracto 2ª etapa	20.92	79.08	0.00	14.01	85.00	0.00
		Total extraído				97.39	97.90	0.00

SE1 y SE2: síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (Tabla III-21).

RM: relación molar borato/carbohidrato usada en la reacción de isomerización.

P=aluminatos precipitados con ácido sulfúrico.

Primera etapa extracción (0-3 horas): 150 bar, 80 °C y 0.6 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

Segunda etapa extracción (3-6 horas): 100 bar, 100 °C y 0.4 mL/min⁻¹ de etanol/agua 95/5 (v/v).

carb.=carbohidrato.

Para la extracción supercrítica de los trisacáridos, los experimentos se realizaron de la misma forma que para las muestras isomerizadas con aluminato sódico, es decir, incrementando el contenido en agua del modificador y añadiendo ácido sulfúrico en algunos experimentos. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla III-31. De la misma manera que para los aluminatos, las primeras seis horas (primera y segunda etapa) de los experimentos se llevaron a cabo usando etanol/agua 95:5 (v/v) como modificador. En la Figura III-46 aparecen los cromatogramas de la primera, segunda y tercera etapa (con un 10% (v) de agua en el modificador).

Tabla III-31. Extracción supercrítica en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con boratos (relación molar 2:1 boratos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 52.02% monosacáridos (M), 32.41% disacáridos (D) y 15.57% trisacáridos (T).

Etapa extracción / modificador empleado	Tiempo extracción	composición (% peso)			% M extraído	% D extraído	% T extraído	mg B/Kg carb.
		% M	% D	%T				
1ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	0-3 h	91.76	8.24	0.00	82.02	11.82	0.00	10.27
2ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	3-6 h	22.61	77.39	0.00	15.34	84.29	0.00	2.16
total extraído 6 h					97.36	96.11	0.00	
Ensayos extracción 3ª etapa:								
3ª etapa / etanol:agua 92.5:7.5 v/v	6-7 h	7.44	55.37	37.19	0.37	4.39	6.14	8.54
	7-8 h	9.88	50.29	39.83	0.71	5.81	9.58	4.20
	8-9 h	8.11	33.98	57.91	0.17	1.12	3.98	8.28
total extraído 9 h					98.61	107.43	19.70	
3ª etapa / etanol:agua 90:10 v/v	6-7 h	9.20	10.30	80.50	1.30	2.33	37.90	2.10
	7-8 h	6.33	8.59	85.08	1.09	2.38	49.04	1.27
	8-9 h	2.70	0.00	97.30	0.05	0.00	5.45	8.34
	9-10 h	1.90	0.00	98.10	0.02	0.00	3.20	12.09
	10-11 h	4.90	0.00	95.10	0.01	0.00	0.66	33.38
total extraído 9 h					99.83	100.82	96.25	
3ª etapa / etanol:agua 87.5:12.5 v/v	6-7 h	9.90	10.88	79.22	1.58	2.78	42.11	15.79
	7-8 h	5.25	7.94	86.81	0.97	2.35	53.39	9.40
total extraído 8 h					99.91	101.24	95.50	
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9.9:0.1 v/v/v	6-7 h	4.01	7.13	88.86	0.46	1.32	34.29	2.49
	7-8 h	4.68	13.74	81.58	0.75	3.52	43.52	1.32
	8-9 h	3.78	8.22	88.00	0.14	0.48	10.63	2.30
total extraído 9 h					98.71	101.43	88.44	
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9:1 v/v/v	6-7 h	9.00	12.47	78.53	0.99	2.20	28.87	1.89
	7-8 h	11.21	16.89	71.91	1.47	3.55	31.44	0.87
	8-9 h	10.15	12.88	76.97	0.61	1.23	15.36	0.65
total extraído 9 h					100.43	103.09	75.67	

Para las muestras que contenían ácido bórico los resultados obtenidos en los ensayos de extracción supercrítica fueron muy similares a los obtenidos en las muestras que contenían aluminato sódico en términos de rendimiento, pureza y selectividad. La extracción de trisacáridos con elevadas purezas y rendimientos fue posible aumentando el contenido de agua en el modificador hasta un 12.5 %. La concentración de boro en los extractos fue similar que para los experimentos que usaron aluminato sódico. Cuando se añadieron pequeños porcentajes de ácido sulfúrico en el modificador (0.1 y 1 % volumen, respectivamente), el rendimiento de la extracción de trisacáridos disminuyó ligeramente, pero la pureza se mantuvo. La concentración de boro se redujo significativamente en comparación con los experimentos que se llevaron a cabo empleando únicamente etanol/agua (en diferentes proporciones) como modificador. Al igual que ocurría para los extracciones que empleaban como agente complejante el aluminato sódico, los análisis realizados a las diferentes muestras de trisacáridos extraídas empleando un modificador con

diferentes porcentajes de ácido sulfúrico revelaron que ninguna de esas muestras contenían ácido sulfúrico.

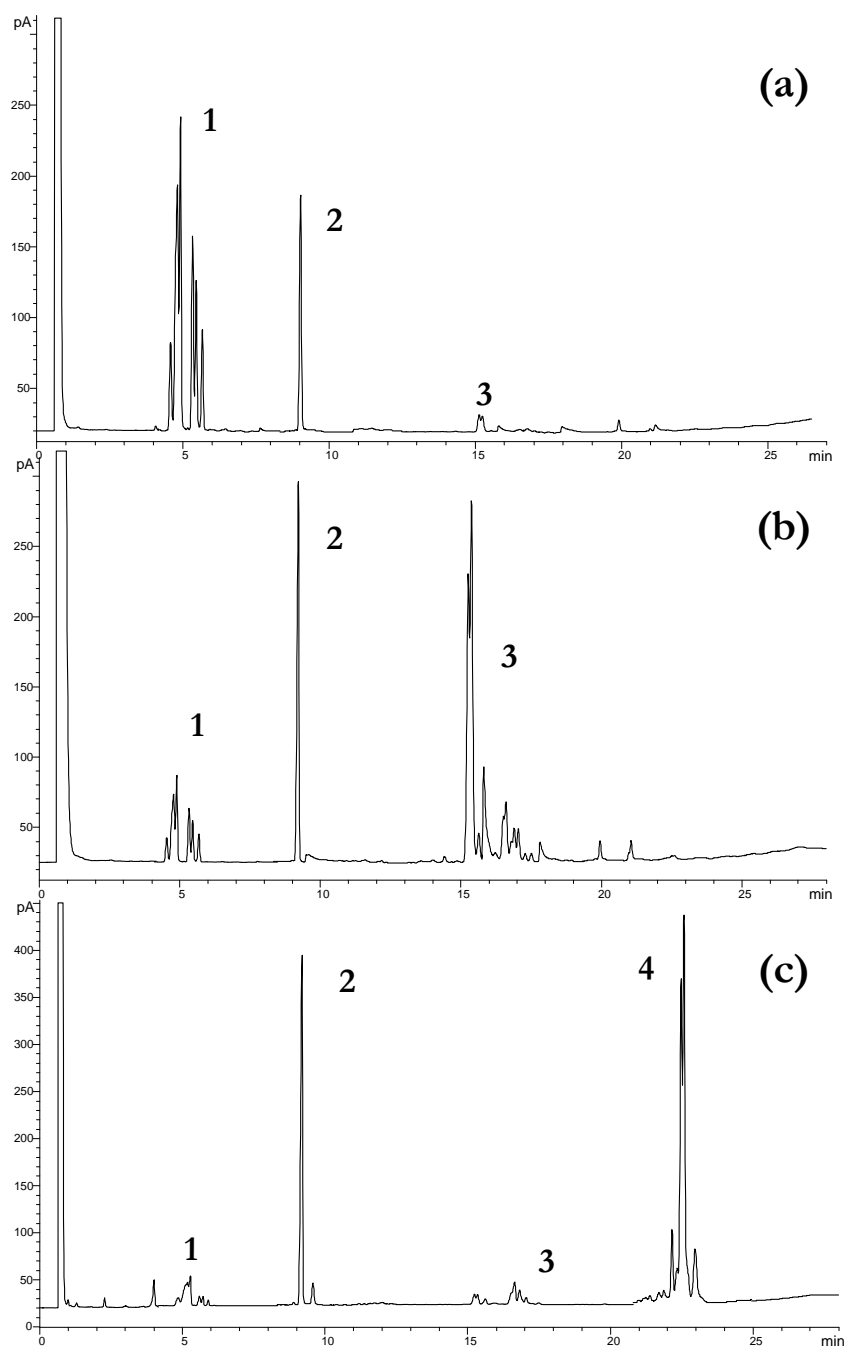


Fig. III-46.-Cromatogramas de los experimentos (a) 1ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (b) 2ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (c) 3ª etapa etanol/agua 90:10 v/v. 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.

Al igual que para las extracciones supercríticas de muestras de GOS isomerizadas con ácido bórico, no hubo extracción preferencial de las cetosas, dando, en todas las condiciones estudiadas, una relación similar (Tabla III-32).

Tabla III-32. Relación aldosas/cetosos de las extracciones supercríticas en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con boratos (relación molar 2:1 boratos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 52.02% monosacáridos (M), 32.41% disacáridos (D) y 15.57% trisacáridos (T).

Etapa extracción / modificador empleado	Tiempo extracción	composición (% peso)			Ga/Ta	Glu/Fru	La/Lu	Otros DI N Is/ Otros DI Is	Tri N Is/Tri Is
		% M	% D	% T					
Inicial		52.02	32.41	15.57	1.20	0.69	0.16	0.54	1.53
1ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	0-3 h	91.76	8.24	0.00	1.22	0.73	0.16	0.55	
2ª etapa / etanol:agua 95:5 v/v	3-6 h	22.61	77.39	0.00	1.18	0.65	0.16	0.53	
Ensayos extracción 3ª etapa:									
3ª etapa / etanol:agua 92.5:7.5 v/v	6-7 h	7.44	55.37	37.19	1.18	0.73	0.20	0.57	1.49
	7-8 h	9.88	50.29	39.83	1.24	0.70	0.14	0.52	1.45
	8-9 h	8.11	33.98	57.91	1.18	0.64	0.14	0.53	1.42
3ª etapa / etanol:agua 90:10 v/v	6-7 h	9.20	10.30	80.50	1.24	0.74	0.13	0.55	1.58
	7-8 h	6.33	8.59	85.08	1.22	0.72	0.14	0.52	1.50
	8-9 h	2.70	0.00	97.30	1.16	0.69	0.20	0.54	1.52
	9-10 h	1.90	0.00	98.10	1.21	0.66	0.21	0.56	1.54
	10-11 h	4.90	0.00	95.10	1.17	0.64	0.12	0.53	1.49
3ª etapa / etanol:agua 87.5:12.5 v/v	6-7 h	9.90	10.88	79.22	1.24	0.64	0.13	0.51	1.57
	7-8 h	5.25	7.94	86.81	1.16	0.74	0.19	0.57	1.47
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9.9:0.1 v/v/v	6-7 h	4.01	7.13	88.86	1.25	0.64	0.18	0.59	1.52
	7-8 h	4.68	13.74	81.58	1.19	0.68	0.18	0.55	1.49
	8-9 h	3.78	8.22	88.00	1.16	0.75	0.12	0.48	1.54
3ª etapa / etanol:agua:H ₂ SO ₄ 90:9:1 v/v/v	6-7 h	9.00	12.47	78.53	1.14	0.67	0.15	0.53	1.50
	7-8 h	11.21	16.89	71.91	1.21	0.74	0.14	0.52	1.53
	8-9 h	10.15	12.88	76.97	1.25	0.66	0.19	0.57	1.48

Ga/Ta= relación galactosa/tagatosa

Glu/Fru= relación glucosa/fructosa

La/Lu= relación lactosa/lactulosa

Otros DI N Is/ Otros DI Is= relación entre otros disacáridos (diferentes a la lactosa y la lactulosa) no isomerizados y otros disacáridos isomerizados

Tri N Is/Tri Is= relación entre trisacáridos no isomerizados e isomerizados

3.5.2. Conclusiones

En este apartado se ha llevado a cabo un proceso en tres etapas para purificar GOS empleando fluidos supercríticos. Bajo las condiciones optimizadas, los monosacáridos (especialmente glucosa) presentes como subproductos no deseables en las mezclas isomerizadas de GOS se eliminaron completamente. También, en las condiciones óptimas se eliminaron los disacáridos como la lactosa, favoreciendo el uso de la mezcla resultante en productos para personas intolerantes a la lactosa.

Finalmente, incluyendo un tercer paso de extracción supercrítica, es posible obtener un extracto con alto contenido en trisacáridos. Cuando se lleva a cabo la precipitación de los agentes complejantes empleados para la isomerización (aluminatos y boratos) es posible obtener un completo fraccionamiento de los carbohidratos presentes en mezclas de GOS isomerizadas según su peso molecular y casi libres de aluminio o boro.

3.6. Escalado del proceso para la extracción selectiva de carbohidratos prebióticos a partir de las mezclas obtenidas en el apartado 3.5

El objetivo de este apartado era el escalado del proceso más favorable para la obtención de carbohidratos prebióticos obtenido en el apartado 3.5, en este caso galactooligosacáridos. Para ello se empleó un software de simulación (AspenOne® V7 de AspenTech), para en primer lugar simular el proceso y en segundo lugar escalarlo y ver su viabilidad y rentabilidad a escala industrial.

Los pasos que se siguieron para llevar a cabo este objeto están resumidos en la Figura III-47:

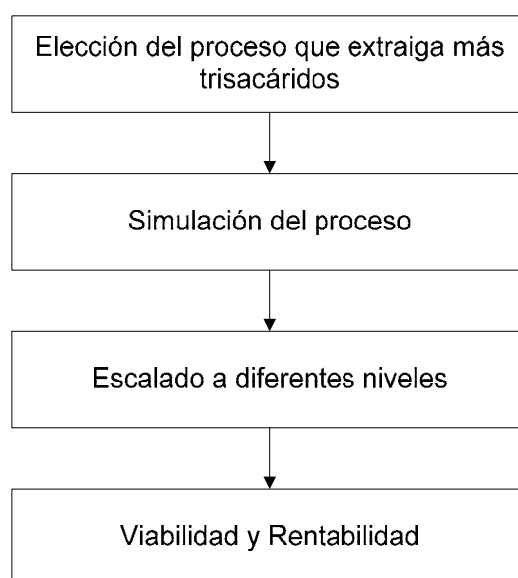


Fig. III-47.-Diagrama de flujo del proceso

3.6.1. Resultados y Discusión

3.6.1.1. Elección del proceso con mayor cantidad de carbohidratos prebióticos

Se eligió el proceso que extrajera mayor cantidad de trisacáridos (GOS) para llevar a cabo la simulación empleando el software AspenOne® V7 de AspenTech. El proceso elegido fue la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2 apartado 3.5) e isomerizada con aluminatos (relación molar 2:1 aluminatos/carbohidratos) y una composición inicial de la mezcla de carbohidratos (% en peso) previa a la extracción supercrítica de 50.93% de monosacáridos, 32.11% de disacáridos y 16.96% de trisacáridos. El resultado de la extracción supercrítica en las tres etapas fue del 100% de monosacáridos,

disacáridos y trisacáridos extraídos, con un extracto en la primera etapa con más del 90% de monosacáridos, en la segunda etapa un extracto con más del 80% de disacáridos y en la tercera etapa se obtenía un extracto casi del 80% de contenido en trisacáridos.

La simulación se llevó a cabo empleando el software AspenPlus V7 incluido en paquete informático AspenOne® V7. En primer lugar se definieron los compuestos que formarían parte de esta simulación: etanol, agua, dióxido de carbono y la mezcla de carbohidratos. El siguiente paso fue simplificar la mezcla (259-263) de carbohidratos, ya que se trata de mezclas complejas con gran cantidad de compuestos y es muy difícil encontrar sus propiedades físicas en una base de datos convencional. Por lo tanto, era necesario crear en el simulador compuestos hipotéticos. Los tres compuestos elegidos para que representaran los tres grados de polimerización presentes en nuestro proceso fueron, glucosa para monosacáridos, lactosa para disacáridos y maltotriosa para trisacáridos. Se emplearon estos compuestos por estar disponibles en la base de datos del software AspenPlus V7. En la base de datos de AspenPlus V7, el paquete termodinámico elegido fue la ecuación de SRK. El tercer paso fue dividir la simulación en tres partes: 1) extracción de monosacáridos según las condiciones óptimas del proceso obtenidas en 3.5; 2) extracción de disacáridos según las condiciones óptimas del proceso obtenidas en 3.5; y 3) extracción de trisacáridos según las condiciones óptimas del proceso obtenidas en 3.5. Finalmente se definió el proceso tal como se muestra en la Figura III-48 para cada una de las tres etapas:

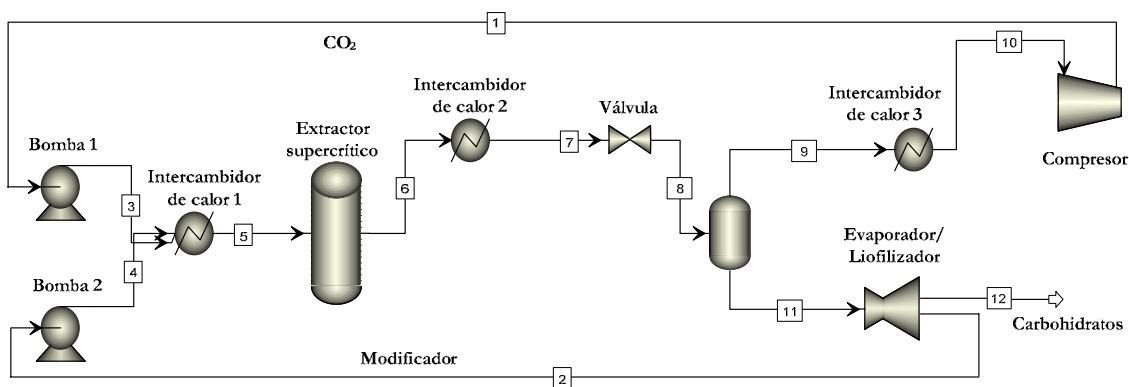


Fig. III-48.-Diagrama de flujo de la simulación del proceso con el software AspenPlus V7

Las presiones, temperaturas, flujo y composición del modificador del proceso fueron las empleadas en el apartado 3.5.

3.6.1.2. Simulación del proceso

Como se ha dicho en el apartado anterior, el proceso se dividió en tres etapas diferentes. En primer lugar se eligieron las cantidades de cada compuesto a emplear en la simulación. Se decidió multiplicar por un millón los flujos del proceso usados a escala de

laboratorio para obtener una cantidad sustancial de carbohidratos que pudiera hacer viable el proceso económicamente. Los flujos empleados de los distintos compuestos y en las diferentes partes de la simulación aparecen en la Tabla III-33. En la simulación se supuso que los carbohidratos se encontraban depositados en la celda. En el proceso, el CO₂, el etanol y el agua eran bombeados y calentados hasta llegar a la celda de extracción a la temperatura y presión de trabajo. En la celda, el fluido supercrítico disolvía el carbohidrato. Mediante la válvula se disminuía la presión y el CO₂ se convertía en gas y era eliminado mediante el flujo 9. Los carbohidratos permanecían disueltos en el etanol/agua en estado líquido. Finalmente, el disolvente era evaporado o la muestra liofilizada. El modificador era recuperado, mientras que los carbohidratos permanecían en estado sólido y eran retirados libres de disolvente. Este paso aparece en el mismo diagrama de flujo que el resto del proceso a pesar de que la viabilidad técnica obligase a llevarlo a cabo aparte.

Tanto el dióxido de carbono como la mezcla etanol/agua eran reutilizados y se suponía que no contenían impurezas.

Tabla III-33. Flujos de los distintos compuesto en la simulación del proceso de extracción supercrítica.

ETAPA 1 (150 bar/80 °C/0.6 mLmin⁻¹ etanol/agua 95:5 v/v/3 horas)				
Número Flujo	CO ₂ (Kg/h)	Etanol (Kg/h)	Agua (Kg/h)	Glucosa (Kg/h)
1	72000	-----	-----	-----
2	-----	27360	1800	-----
3	72000	-----	-----	-----
4	-----	27360	1800	-----
5	72000	27360	1800	-----
6	72000	27360	1800	33.96
7	72000	27360	1800	33.96
8	72000	27360	1800	33.96
9	72000	-----	-----	-----
10	72000	-----	-----	-----
11	-----	27360	1800	33.96
12	-----	-----	-----	33.96
ETAPA 2 (100 bar/100 °C/0.4 mLmin⁻¹ etanol/agua 95:5 v/v/3 horas)				
Número Flujo	CO ₂ (Kg/h)	Etanol (Kg/h)	Agua (Kg/h)	Lactosa (Kg/h)
1	72000	-----	-----	-----
2	-----	18240	1200	-----
3	72000	-----	-----	-----
4	-----	18240	1200	-----
5	72000	18240	1200	-----
6	72000	18240	1200	21.42
7	72000	18240	1200	21.42
8	72000	18240	1200	21.42
9	72000	-----	-----	-----
10	72000	-----	-----	-----
11	-----	18240	1200	21.42
12	-----	-----	-----	21.42
ETAPA 3 (150 bar/80 °C/0.6 mLmin⁻¹ etanol/agua 90:10 v/v/2 horas)				
Número Flujo	CO ₂ (Kg/h)	Etanol (Kg/h)	Agua (Kg/h)	Maltotriosa (Kg/h)
1	72000	-----	-----	-----
2	-----	25920	3600	-----
3	72000	-----	-----	-----

4	-----	25920	3600	-----
5	72000	25920	3600	-----
6	72000	25920	3600	16.98
7	72000	25920	3600	16.98
8	72000	25920	3600	16.98
9	72000	-----	-----	-----
10	72000	-----	-----	-----
11	-----	25920	3600	16.98
12	-----	-----	-----	16.98

Una vez definida la simulación se importó el proceso al software Aspen Process Economic Analyzer V7 para su posterior evaluación de la viabilidad y rentabilidad del proceso.

3.6.1.3. Determinación de la viabilidad económica del proceso

En primer lugar se estudió la viabilidad económica del proceso del apartado 3.6.1.2. Para estimar esa rentabilidad se partió de un proceso perfecto, donde las materias primas eran reutilizadas sin contener impurezas y no había tiempos muertos entre las etapas del proceso. De esta manera se pretendía ver si en las condiciones óptimas era rentable el proceso, si no lo era ya no merecía la pena continuar.

Para ello se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

1. Precio de las materias primas:
 - 1.1. $\text{CO}_2 = 0.22 \text{ €/Kg}$
 - 1.2. Etanol = 0.0257 €/Kg (Chemical Market Reporter, 2008).
 - 1.3. Agua = 0.00106 €/Kg (datos de la Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamientos, AEAS, 2007).
 - 1.4. Suero de quesería (a pesar de no ser la materia prima empleada en este proceso, si es la materia a prima inicial para obtener la mezcla de carbohidratos prebióticos del proceso) = 0 €/Kg (al ser un subproducto del queso y considerado un residuo).
2. Precio de los productos obtenidos (se estimaron a partir de Lifran *et al.* (143)):
 - 2.1. Trisacáridos GOS= 44 €/Kg
 - 2.2. Disacáridos= 22 €/Kg
 - 2.3. Monosacáridos= 13.2 €/Kg
3. Horas de funcionamiento del proceso:
 - 3.1. 24 horas al día, 365 al año.

Puede parecer que los precios pagados por los productos obtenidos son mayores a los del mercado. Pero hay que tener en cuenta que los precios suministrados por Lifran *et al.* (143) son de 2007 y para productos, en el caso de los GOS, con una concentración de estos del 55%. En el producto obtenido en la tercera etapa por el proceso supercrítico la concentración de GOS se sitúa entre el 78 y el 84%. Para los productos obtenidos en la primera etapa (monosacáridos) la concentración obtenida era del 92%, siendo mayoritariamente monosacáridos isomerizados como tagatosa (carácter prebiótico) y fructosa. En la segunda etapa (disacáridos) la concentración obtenida fue del 80 %, siendo mayoritariamente lactulosa (carácter prebiótico también) y otros disacáridos isomerizados. Por lo tanto, es lógico pensar que el precio de estos productos será mayor que los que aparecen en el artículo de Lifran *et al.* (143). Además el producto obtenido en este proceso estaría en estado sólido, mientras que los que se venden comercialmente suelen estar en forma de jarabe. También es de esperar que esos precios aumenten ya que se estimaba que el crecimiento anual de la demanda oscilaría entre el 5 y el 20 % anual (143).

Se tuvo en cuenta una vida económica del proyecto de 20 años, una tasa de impuestos del 30%, una tasa de interés de los préstamos concedidos del 20% y como método de depreciación se utilizó fue el método de amortización simple (straight line en inglés). La duración de la fase de ingeniería, obtención de equipos y permisos y construcción se estimó en 41 semanas. El precio de los equipos fue estimado por el software en función de las condiciones de operación del proceso. Los gastos de salarios, electricidad, agua potable, carburante, etc. fueron estimados por el software en base a la localización geográfica del proceso (en nuestro caso Barcelona). Los resultados que se obtuvieron para este proceso se resumen en la Tabla III-34.

Tabla III-34. Resumen de los parámetros más importantes del proceso.

INVERSIÓN	
Coste total del proyecto	6.808.789,24 €
Costes totales operativos	2.420.336,48 €
Costes totales materiales	37.638,55 €
Ingresos por producto	4.975.680,00 €
Periodo de retorno de la inversión	7,64 años
RESUMEN DEL PROYECTO	
Costes de operación	1.182.600 €
Costes de mantenimiento	89.242,50 €
Operating charges	295.650,00 €
Gastos relacionados con servicios, nóminas e instalaciones	635.921,25 €
Gastos generales y administrativos	179.284,18 €

RESUMEN DEL CAPITAL	
Equipos	2.087.500,00 €
Instalación de los equipos	10.584,60 €
Tuberías	302.454,90 €
Civil	60.365,00 €
Acero	20.370,40 €
Instrumentación	655.450,10 €
Electricidad	450.442,50 €
Aislamiento	84.084,50 €
Pintura	9.853,80 €
Otros	1.282.800,00 €
Subcontratos	0,00 €
Gastos generales y administrativos indirectos	125.781,20 €
Contratista	212.858,00 €
Contingencias	954.458,20 €
Cargos especiales	0,00 €
Coste total del proyecto	6.257.004,00 €
Coste total del proyecto ajustado	6.808.789,24 €
INGENIERÍA	
Ingeniería básica	163.500,00 €
Ingeniería en detalle	376.900,00 €
Materiales	145.400,00 €
Oficina central	85.400,00 €
Total diseño e ingeniería	771.200,00 €
MATERIAS PRIMAS E INGRESOS POR PRODUCTO	
Coste materias primas por hora	1,91 €/hora
Coste total materias primas	16.742,01 €
Ventas producto por hora	568,00 €/hora
Ventas totales producto	4.975.680,00 €
MANO DE OBRA Y MANTENIMIENTO	

Mano de obra	
Operarios por turno	5
Coste operarios por hora	20,00 €/hora
Coste total operarios	876.000 €
Mantenimiento	89.242,50 €
Supervisión	
Supervisores por turno	1
Coste supervisores por hora	35,00 €/hora
Coste total supervisores	306.600,00 €

Como se puede observar el proceso es rentable al cabo de casi ocho años. Como las especificaciones que se han tenido en cuenta en este proceso pueden variar, se ha llevado a cabo también un estudio variando algunos de los parámetros empleados en el estudio. Se han tenido en cuenta diferentes escenarios:

1. Precios de los productos obtenidos en el proceso:
 - a. Trisacáridos GOS= 44 €/Kg; Disacáridos= 22 €/Kg;
Monosacáridos= 13.2 €/Kg
 - b. Trisacáridos GOS= 22 €/Kg; Disacáridos= 11 €/Kg;
Monosacáridos= 6.6 €/Kg
 - c. Trisacáridos GOS= 38.5€/Kg; Disacáridos= 17.6 €/Kg;
Monosacáridos= 8.8 €/Kg
 - d. Trisacáridos GOS= 55 €/Kg; Disacáridos= 38.5 €/Kg;
Monosacáridos= 17.6 €/Kg
2. Horas de funcionamiento del proceso:
 - a. 8000 horas/año
 - b. 8760 horas/año
 - c. 8400 horas/año
3. Escalado del proceso (% del proceso inicial):
 - a. 50
 - b. 75
 - c. 90
 - d. 100
 - e. 125
 - f. 150

La variable que se resume en los resultados es el tiempo de recuperación de la inversión (en años), ya que refleja muy claramente la rentabilidad del proceso. La Tabla III-35 muestra todas las combinaciones posibles con las tres variables estudiadas:

Tabla III-35. Resultados de recuperación de la inversión en años para las combinaciones de las tres variables estudiadas.

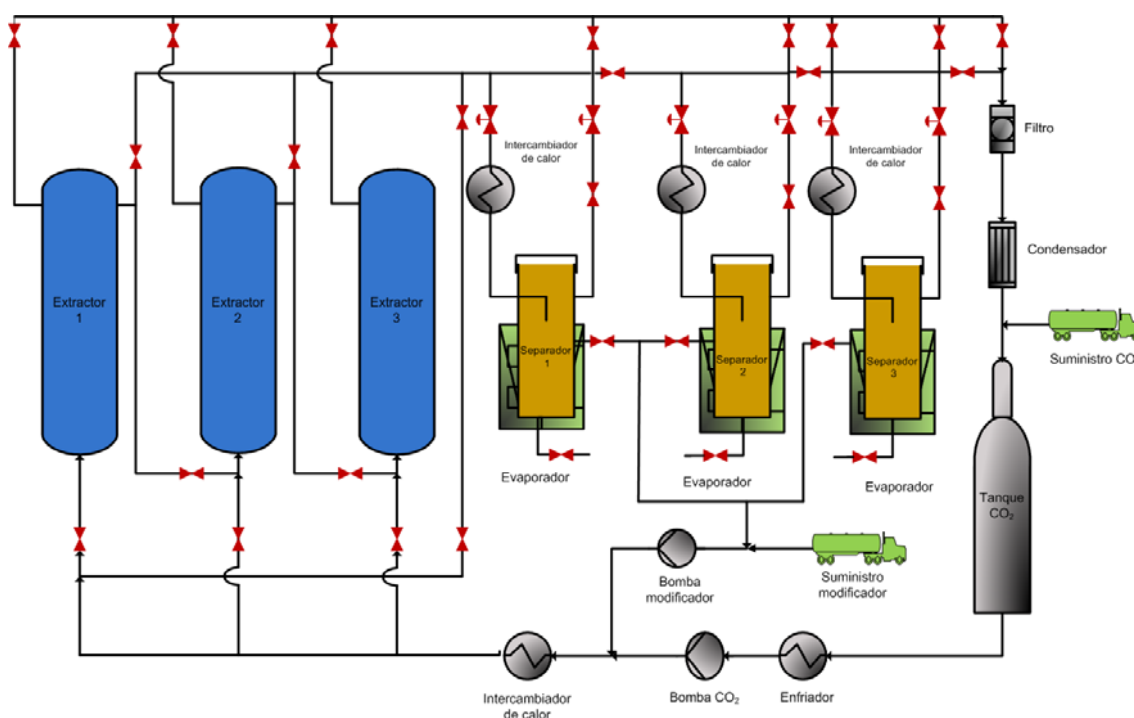
	Precio a			Precio b			Precio c			Precio d		
Escalado (%)	Funcionamiento (h)			Funcionamiento (h)			Funcionamiento (h)			Funcionamiento (h)		
	8000	8760	8400	8000	8760	8400	8000	8760	8400	8000	8760	8400
50	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
75	---	16.87	18.66	---	---	---	---	---	---	7.03	6.41	6.69
90	9.86	8.79	9.26	---	---	---	---	---	---	4.72	4.38	4.53
100	8.49	7.64	8.00	---	---	---	---	16.86	18.71	4.45	4.13	4.28
125	5.17	4.79	4.95	---	---	---	---	7.36	7.70	3.29	3.10	3.18
150	3.27	3.08	3.17	9.76	8.70	9.16	8.14	3.96	4.09	2.82	2.68	2.74

---: proceso no rentable

Como se puede observar de la Tabla III-35, para obtener un proceso rentable, se necesita al menos el 75% de la producción actual, producciones inferiores hacen inviable el proceso. A mayor producción se reduce la diferencia de rentabilidad en función de las horas en funcionamiento. Cuando la producción es el 150% de la inicial, el proceso es rentable para todos los escenarios.

Sin embargo, no se ha tenido en cuenta la localización geográfica tanto del lugar físico del proceso como del diseño ingenieril, que también podría afectar a la rentabilidad del proceso. La localización física del proceso también podría influir a la hora de recibir subvenciones. En este caso, situado en Barcelona, podría acogerse, entre otras, a las ayudas que concede el Ministerio de Industria, Turismo y Comercio del Gobierno de España y el Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDEA) en el marco del apoyo público por tonelada de CO₂ evitada (Plan de Acción 2008-2012 de la Estrategia de Ahorro y Eficiencia Energética). También podrían ser pedidas ayudas económicas a fondo perdido o no a la comunidad autónoma o a la Unión Europea.

Finalmente, se ha realizado un esbozo (Figura III-49) de lo que podría ser el proceso industrial real con varios extractores supercríticos y celdas recolectoras para evitar pérdidas de tiempo durante la carga, descarga y limpieza de la materia prima.



3.6.2. Conclusiones

En este apartado se ha analizado la viabilidad económica del proceso de extracción supercrítica de carbohidratos prebióticos a partir de mezclas de carbohidratos. Se puede concluir que se trata de un proceso económicamente viable para elevadas producciones. Para producciones menores la rentabilidad disminuye considerablemente. Sin embargo, aún deben mejorarse aspectos del proceso que mejorarían notablemente la rentabilidad del proceso, como el aumento de la solubilidad de los carbohidratos en el fluido supercrítico, que permitiría un incremento importante en la producción de éstos con la misma cantidad de fluido supercrítico y con el consiguiente aumento de los ingresos. También influyen los precios a los que se venden los carbohidratos, muy inferiores respecto, por ejemplo, a los de los aceites esenciales.

El tema del diseño de procesos supercríticos ha sido apenas apuntado en la literatura y no se han encontrado trabajos que aborden la factibilidad económica de procesos supercríticos aplicados a la purificación de carbohidratos.

Como resumen, puede decirse que se trata de un proceso industrial supercrítico, muy escasos, realizado a partir de un enfoque novedoso (la separación supercrítica nunca se había empleado para obtener carbohidratos prebióticos altamente enriquecidos) y con una tecnología que respeta más al medio ambiente que las que existen actualmente para obtener estos carbohidratos prebióticos.

Capítulo IV: Conclusiones y Perspectivas de Futuro

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

4.1. Conclusiones

La presente memoria constituye una aportación original en los siguientes aspectos:

1. Se han desarrollado procesos viables para obtener carbohidratos prebióticos altamente enriquecidos a partir de diferentes tipos de mezclas complejas de carbohidratos mediante la tecnología de los fluidos supercríticos, demostrando la validez de la tecnología de los fluidos para la separación de mezclas complejas de carbohidratos. En estos procesos se han optimizado las diferentes variables que afectan a la extracción: presión, temperatura, tipo de modificador, flujo del modificador, tipo de matriz, tiempo de extracción, cantidad de muestra, agente complejante, etc.
2. La tecnología de fluidos supercríticos permite la extracción de carbohidratos procedentes de isomerizados mediante boratos o aluminatos con contenidos en dichos catalizadores por debajo del umbral de seguridad.
3. Se han desarrollado modelos predictivos de utilidad para el posterior escalado de los procesos (modelos termodinámicos de los procesos de separación supercrítica y a presión atmosférica).
4. Los valores de solubilidad de los carbohidratos en alcoholes disponibles en la bibliografía confirmaron que las cetosas son bastante más solubles que sus correspondientes aldosas. Este comportamiento también se observó para la mayoría de los datos experimentales obtenidos para las medidas de solubilidad de cetosas y aldosas en SCCO₂ con diferentes cantidades de etanol:agua como modificador. La adición de agua en el modificador alcohólico aumenta considerablemente la solubilidad, pero la solubilidades relativas mayores entre cetosas y aldosas se obtienen solamente cuando se emplean modificadores con pequeñas cantidades de agua (< 10%).
5. Asimismo, de los diferentes valores de solubilidad a presión atmosférica del Vivinal GOS[®] obtenidos según la composición del disolvente empleado se deduce que este método puede emplearse para la purificación de oligosacáridos mediante extracción con etanol:agua para contenidos de agua entre el 1 y 4% (en volumen).
6. En síntesis, los resultados presentados apoyan la potencialidad de la tecnología de fluidos supercríticos para ser empleados en la industria de los carbohidratos. Los valores de solubilidad y las extracciones supercríticas realizadas demuestran que el fraccionamiento de las mezclas de carbohidratos para aislar carbohidratos prebióticos es posible. Los procesos investigados podrían ser

aplicados para la simplificación de los procesos de purificación y mejorar la calidad del producto en la fabricación de los carbohidratos prebióticos.

4.2. Perspectivas de futuro

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral es un primer paso en la investigación de la tecnología de fluidos supercríticos para la purificación de procedentes de mezclas complejas. Aquí se aportan algunas ideas para continuar la investigación iniciada en este trabajo:

1. Mejorar la solubilidad de los carbohidratos en el fluido supercrítico (CO_2 +modificador): empleando adsorbentes, nuevos fluidos supercríticos (fase móvil) como agua subcrítica o líquidos iónicos. De esta manera se podría ahorrar disolventes o emplear algunos aún menos agresivos con el medio ambiente, además de económicos.
2. Fraccionar las mezclas complejas de carbohidratos prebióticos atendiendo exclusivamente a su peso molecular, si no de acuerdo a su estructura química. De esta manera, se podrían obtener carbohidratos casi puros para añadir en diferentes productos de uso alimentarios y no, tal como se hace actualmente, mezclas de carbohidratos tanto prebióticos como no prebióticos. De este modo se podría disponer de distintos tipos de carbohidratos con elevada pureza y propiedades específicas para su utilización en alimentación. Se podría añadir el carbohidrato adecuado según las necesidades del consumidor.
3. Estudiar como afecta al proceso el distinto tipo de partículas formado durante la extracción según las variables empleadas durante la extracción.
4. Escalado del proceso del laboratorio a planta piloto, empleando tanto técnicas experimentales como software de simulación.
5. Aplicación de técnicas de detección on-line para conocer al momento la composición de los extractos durante el proceso supercrítico.
6. Desarrollar el modelado termodinámico para mezclas complejas de carbohidratos (obtenidas por isomerización, transglicosilación, etc.) para guiar en la toma de decisiones en la parte experimental.

4.3. Final Conclusions

This work represents an original contribution in the following aspects:

1. Feasible processes to obtain highly enriched prebiotic carbohydrates from different types of carbohydrate mixtures have been developed employing supercritical fluid technology. Therefore, we have demonstrated that supercritical technology can be used as a green alternative for producing prebiotic carbohydrates, since it is able to fractionate carbohydrates according to the molecular weight. In these processes, different variables affecting extraction have been optimized: pressure, temperature, modifier, modifier flow rate, type of matrix, extraction time, sample quantity, complexing agent, etc.
2. Supercritical fluid technology permits extraction of isomerized carbohydrates with concentrations below safe limits of complexing agents used during isomerization reactions.
3. New predictive models have been developed for later scale-up processes (thermodynamic modeling of processes at supercritical extraction processes and environmental pressure).
4. Carbohydrate solubility values available in literature confirmed that considering carbohydrates with same degree of polymerization, ketoses are more soluble than its respective aldoses. This behaviour was also observed in supercritical solubility measurements, employing ethanol/water as a modifier. Water increase in modifier increases considerably solubility, but higher relative solubilities between ketoses and aldoses only are obtained when water added to the modifier is below 10 % (% v/v).
5. As well, different Vivinal GOS[®] solubility values obtained at environment pressure according to solvent composition demonstrate this technique could be useful to purify oligosaccharides through extraction with ethanol/water solvent containing 1 to 4 % water (% v/v).
6. Summarizing, results presented in this Thesis support potential of supercritical fluid technology as alternative process to be used in carbohydrate industry. Solubility data and supercritical extractions carried out prove that it is possible to obtain prebiotic carbohydrates highly enriched from complex mixtures. Processes studied could be used in prebiotic carbohydrates manufacturing simplifying purification steps and product quality.

Capítulo V: Bibliografía

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Señoráns, F. J.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A., New Trends in Food Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2003**, 43, (5), 507-526.
2. Arvanitoyannis, I. S.; van Houwelingen-Koukaliasoglou, M., Functional Foods: A Survey of Health Claims, Pros and Cons, and Current Legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2005**, 45, (5), 385-404.
3. Fábregas, J., *Aplicaciones de los alimentos funcionales*, 2003.
4. In *Functional Foods: Scientific and Global Perspectives*, Paris, 2001.
5. Diplock, A. T.; Aggett, P. J.; Ashwell, M.; Bornet, F.; Fern, E. B.; Roberfroid, M. B., Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, **1999**, 81, (4), S1-S27.
6. Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B., Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota - Introducing the Concept of Prebiotics. *Journal of Nutrition*, **1995**, 125, (6), 1401-1412.
7. Gibson, G. R., Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin. *Journal of Nutrition*, **1999**, 129, (7 SUPPL.), 1438S-1441S.
8. Petuely, F., The Bifidus Factor. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **1957**, 82, (46), 1957-1960.
9. Franck, A., Prebiotics Stimulate Calcium Absorption: A Review. *Food Australia*, **2005**, 57, (12), 530-532.
10. Lim, C. C.; Ferguson, L. R.; Tannock, G. W., Dietary Fibres As "Prebiotics": Implications for Colorectal Cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2005**, 49, (6), 609-619.
11. Sanz, M. L.; Cote, G. L.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Prebiotic Properties of Alternansucrase Maltose-Acceptor Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, (15), 5911-5916.
12. Snelling, A. M., Effects of Probiotics on the Gastrointestinal Tract. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **2005**, 18, (5), 420-426.
13. Huebner, J.; Wehling, R. L.; Hutkins, R. W., Functional Activity of Commercial Prebiotics. *International Dairy Journal*, **2007**, 17, (7), 770-775.
14. Olano-Martín, E.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Comparison of the in Vitro Bifidogenic Properties of Pectins and Pectic-Oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, **2002**, 93, (3), 505-511.
15. Palframan, R.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Development of a Quantitative Tool for the Comparison of the Prebiotic Effect of Dietary Oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, **2003**, 37, (4), 281-284.
16. Sanz, M. L.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Influence of Disaccharide Structure on Prebiotic Selectivity in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, (13), 5192-5199.
17. Sanz, M. L.; Polemis, N.; Morales, V.; Corzo, N.; Drakoularakou, A.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., In Vitro Investigation into the Potential Prebiotic Activity of Honey Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, (8), 2914-2921.
18. Vulevic, J.; Rastall, R. A.; Gibson, G. R., Developing a Quantitative Approach for Determining the in Vitro Prebiotic Potential of Dietary Oligosaccharides. *Fems Microbiology Letters*, **2004**, 236, (1), 153-159.
19. Dhiman, R. K.; Sawhney, I. M. S.; Chawla, Y. K.; Das, G.; Ram, S.; Dilawari, J. B., Efficacy of Lactulose in Cirrhotic Patients with Subclinical Hepatic Encephalopathy. *Digestive Diseases and Sciences*, **2000**, 45, (8), 1549-1552.
20. Kolida, S.; Tuohy, K.; Gibson, G. R., Prebiotic Effects of Inulin and Oligofructose. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 87, S193-S197.
21. Pool-Zobel, B.; van Loo, J.; Rowland, I.; Roberfroid, M. B., Experimental Evidences on the Potential of Prebiotic Fructans to Reduce the Risk of Colon Cancer. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 87, S273-S281.
22. Blaut, M., Relationship of Prebiotics and Food to Intestinal Microflora. *Eur J Nutr*, **2002**, 41 Suppl 1, I11-6.
23. Tuohy, K. M.; Probert, H. M.; Smejkal, C. W.; Gibson, G. R., Using Probiotics and Prebiotics to Improve Gut Health. *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, (15), 692-700.
24. Roberfroid, M., Functional Food Concept and Its Application to Prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, **2002**, 34, S105-S110.
25. Scholz-Ahrens, K. E.; Schrezenmeir, J., Inulin, Oligofructose and Mineral Metabolism - Experimental Data and Mechanism. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 87, (SUPPL. 2), S179-S186.
26. Batterman, W. *Lactulose Powder – Main Technological Properties and Its Relevance in Functional Food.* ; Report Solvay Deutschland GmbH 1997.

27. Méndez, A.; Olano, A., Lactulose. A Review of Some Chemical Properties and Applications in Infant Nutrition and Medicine. *Dairy Sci Abstr*, **1979**, 41, 531-535.
28. Schumann, C., Medical, Nutritional and Technological Properties of Lactulose. An Update. *Eur J Nutr*, **2002**, 41 Suppl 1, I17-25.
29. Montgomery, E. M.; Hudson, C. S., Relations between Rotatory Power and Structure in the Sugar Group. Xxvii. Synthesis of a New Disaccharide Ketose (Lactulose) from Lactose. *Journal of the American Chemical Society*, **1930**, 52, 2101-2106.
30. Nagasawa, T.; Obayashi, T.; Mizota, T.; Tomita, M.; Tamura, Y., Process for Preparing a Lactulose Syrup. **1974**.
31. Carobbi, R.; Miletti, S.; Franci, V., Process for Purifying Lactulose Syrup. **1985**.
32. Kozempel, M.; Kurantz, M., A Continuous Reactor System for Production of Lactulose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **1994**, 59, (3), 265-269.
33. Kozempel, M.; McAloon, A.; Roth, L., Simulated Scale-up and Cost Estimate of a Process for Alkaline Isomerization of Lactose to Lactulose Using Boric Acid as Complexation Agent. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **1997**, 68, (2), 229-235.
34. Carubelli, R., Process for Lactulose. **1970**.
35. Hicks, K. B., Ketose Sugars from Aldose Sugars. **1981**.
36. Krumbholz, R. E.; Dorscheid, M. G., Method of Manufacturing Lactulose. **1991**.
37. Mendicino, J. F., Effect of Borate on the Alkali-Catalyzed Isomerization of Sugars. *Journal of the American Chemical Society*, **1960**, 82, (18), 4975-4979.
38. Zokaee, F.; Kaghazchi, T.; Zare, A.; Soleimani, M., Isomerization of Lactose to Lactulose - Study and Comparison of Three Catalytic Systems. *Process Biochemistry*, **2002**, 37, (6), PII S0032-9592(01)00251-5.
39. Olano, A., Solubility of Lactose and Lactulose in Alcohols. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, **1979**, 16, (6), 260-261.
40. Montañés, F.; Olano, A.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Modeling Solubilities of Sugars in Alcohols Based on Original Experimental Data. *Aiche Journal*, **2007**, 53, (9), 2411-2418.
41. Gasparotti, F. A., Process for Producing Lactulose. **1980**.
42. de la Fuente, M. A.; Juárez, M.; de Rafael, D.; Villamiel, M.; Olano, A., Isomerization of Lactose Catalyzed by Alkaline-Substituted Sepiolites. *Food Chemistry*, **1999**, 66, (3), 301-306.
43. Villamiel, M.; Corzo, N.; Foda, M. I.; Montes, F.; Olano, A., Lactulose Formation Catalysed by Alkaline-Substituted Sepiolites in Milk Permeate. *Food Chemistry*, **2002**, 76, (1), 7-11.
44. Hramtsov, A. G.; Evdokimov, I. A.; Ryabtseva, S. A.; Lodygin, A. D.; Alieva, L. R., Reception of Lactulose Preparations for Products of Functional Nutrition. *Biotechnology in Agriculture and the Food Industry*, **2004**, 171-173.
45. Sako, T.; Matsumoto, K.; Tanaka, R., Recent Progress on Research and Applications of Non-Digestible Galacto-Oligosaccharides. *International Dairy Journal*, **1999**, 9, (1), 69-80.
46. Mayerhofer, F.; Petuely, F., Untersuchungen Zur Regulation Der Darmtatigkeit Des Erwachsenen Mit Hilfe Der Lactulose (Bifidus-Faktor). *Wien Klin Wochenschr*, **1959**, 71, 865-869.
47. Blei, A. T.; Cordoba, J.; Practice Parameters Comm Am Coll, G., Hepatic Encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology*, **2001**, 96, (7), 1968-1976.
48. Conn, H. O., Effects of High-Normal and Low-Normal Serum Potassium Levels on Hepatic-Encephalopathy - Facts, Half-Facts or Artifacts. *Hepatology*, **1994**, 20, (6), 1637-1640.
49. Conn, H. O.; Leevy, C. M.; Vlahcevic, Z. R.; Rodgers, J. B.; Maddrey, W. C.; Seeff, L.; Levy, L. L., Comparison of Lactulose and Neomycin in Treatment of Chronic Portal-Systemic Encephalopathy - Double-Blind Controlled Trial. *Gastroenterology*, **1977**, 72, (4), 573-583.
50. van den Heuvel, E.; Muijs, T.; Van Dokkum, W.; Schaafsma, G., Lactulose Stimulates Calcium Absorption in Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, **1999**, 14, (7), 1211-1216.
51. McCutcheon, J.; Fulton, J. D., Lowered Prevalence of Infection with Lactulose Therapy in Patients in Long-Term Hospital-Care. *Journal of Hospital Infection*, **1989**, 13, (1), 81-86.
52. Bianchi, G. P.; De Mitri, M. S.; Bugianesi, E.; Abbiati, R.; Fabbri, A.; Marchessini, G., Lowering Effects of a Preparation Containing Fibres and Lactulose on Glucose and Insulin Levels in Obesity. *Italian Journal of Gastroenterology*, **1994**, 26, (4), 174-178.

53. Conte, D.; Bardella, M. T.; Bernardi, R.; Pasetti, G.; Bianchi, P. A., Hypcholesterolemic Effect of Lactulose in Man: A Preliminary Report. *Panminerva medica*, **1977**, 19, (1), 1-4.
54. Genovese, S.; Riccardi, G.; Rivellese, A. A., Lactulose Improves Blood Glucose Response to an Oral Glucose Test in Non-Insulin Dependent Diabetic Patients. *DNM*, **1993**, 5, 295-297.
55. Lindmark-Mansson, H.; Fondén, R.; Pettersson, H. E., Composition of Swedish Dairy Milk. *International Dairy Journal*, **2003**, 13, (6), 409-425.
56. Aider, M.; de Halleux, D., Isomerization of Lactose and Lactulose Production: Review. *Trends in Food Science & Technology*, **2007**, 18, (7), 356-364.
57. Ghaly, A. E.; Ramkumar, D. R.; Sadaka, S. S.; Rochon, J. D., Effect of Reseeding and Ph Control on the Performance of a Two-Stage Mesophilic Anaerobic Digester Operating on Acid Cheese Whey. *Canadian Agricultural Engineering*, **2000**, 42, (4), 173-183.
58. Kosaric, N.; Asher, Y., Cheese Whey and Its Utilization. *Conservation and Recycling*, **1982**, 5, (1), 23-32.
59. Calli, B.; Yukselen, M. A., Anaerobic Treatment by a Hybrid Reactor. *Environmental Engineering Science*, **2002**, 19, (3), 143-150.
60. Mawson, A. J., Bioconversions for Whey Utilization and Waste Abatement. *Bioresource Technology*, **1994**, 47, (3), 195-203.
61. Cheetham, P. S. J.; Wootton, A. N., Bioconversion of D-Galactose into D-Tagatose. *Enzyme and Microbial Technology*, **1993**, 15, (2), 105-108.
62. Saunders, J. P.; Donner, T. W.; Sadler, J. H.; Levin, G. V.; Makris, N. G., Effects of Acute and Repeated Oral Doses of D-Tagatose on Plasma Uric Acid in Normal and Diabetic Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **1999**, 29, (2), S57-S65.
63. Levin, G. V., Tagatose, the New Gras Sweetener and Health Product. *Journal of Medicinal Food*, **2002**, 5, (1), 23-36.
64. Levin, G. V.; Zehner, L. R.; Saunders, J. P.; Beadle, J. R., Sugar Substitutes - Their Energy Values, Bulk Characteristics, and Potential Health Benefits. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1995**, 62, (5), S1161-S1168.
65. Livesey, G.; Brown, J. C., D-Tagatose Is a Bulk Sweetener with Zero Energy Determined in Rats. *Journal of Nutrition*, **1996**, 126, (6), 1601-1609.
66. Donner, T. W.; Wilber, J. F.; Ostrowski, D., D-Tagatose, a Novel Hexose: Acute Effects on Carbohydrate Tolerance in Subjects with and without Type 2 Diabetes. *Diabetes Obesity & Metabolism*, **1999**, 1, (5), 285-291.
67. Bertelsen, H.; Jensen, B. B.; Buemann, B., D-Tagatose - a Novel Low-Calorie Bulk Sweetener with Prebiotic Properties. *Low-Calorie Sweeteners: Present and Future*, **1999**, 85, 98-109.
68. Buemann, B.; Toubro, S.; Raben, A.; Astrup, A., Human Tolerance to a Single, High Dose of D-Tagatose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **1999**, 29, (2), S66-S70.
69. Buemann, B.; Toubro, S.; Raben, A.; Blundell, J.; Astrup, A., The Acute Effect of D-Tagatose on Food Intake in Human Subjects. *British Journal of Nutrition*, **2000**, 84, (2), 227-231.
70. Additives, F. W. e. c. o. F., D-Tagatose. **2006**.
71. Anon, Fao/Who Recommends Tagatose. *International Sugar Journal*, **2001**, 103, (1232), 321-321.
72. Rollini, M.; Manzoni, M., Bioconversion of D-Galactitol to Tagatose and Dehydrogenase Activity Induction in *Gluconobacter Oxydans*. *Process Biochemistry*, **2005**, 40, (1), 437-444.
73. Donner, T.; Wilber, J.; Ostrowski, D., D-Tagatose: A Novel Therapeutic Adjunct for Non-Insulin-Dependent Diabetes. *Diabetes*, **1996**, 45, 457-457.
74. Donner, T. W., The Metabolic Effects of Dietary Supplementation with D-Tagatose in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes*, **2006**, 55, A110-A110.
75. Lu, Y.; Levin, G. V.; Donner, T. W., Tagatose, a New Antidiabetic and Obesity Control Drug. *Diabetes Obesity & Metabolism*, **2008**, 10, (2), 109-134.
76. Seri, S.; D'Allessandro, A.; Acitelli, S.; Giammaria, U.; Cocchi, M.; Noble, R. C., Effects of Dietary Supplementation by Alternative Oils on Blood Lipid Levels of Haemodialysed Patients. *Medical Science Research*, **1993**, 21, (8), 315-316.
77. Buemann, B.; Toubro, S.; Holst, J. J.; Rehfeld, J. F.; Bibby, B. M.; Astrup, A., D-Tagatose, a Stereoisomer of D-Fructose, Increases Blood Uric Acid Concentration. *Metabolism: Clinical and Experimental*, **2000**, 49, (8), 969-976.
78. Moore, M. C., Drug Evaluation: Tagatose in the Treatment of Type 2 Diabetes and Obesity. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **2006**, 7, (10), 924-935.

79. Paterna, J. C.; Boess, F.; Stäubli, A.; Boelsterli, U. A., Antioxidant and Cytoprotective Properties of D-Tagatose in Cultured Murine Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1998**, 148, (1), 117-125.
80. Rosenplenter, K.; Mende, K., Use of D-Tagatose as a Flavor Enhancer in Foods, Beverages, Chewing Gum and Tablets. WO2004073419-A1; DE10307445-A1; AU2004212702-A1; EP1594370-A1; US2006159801-A1, **2004**.
81. Levin, G., Increased Fertility and Improved Fetal Development Drug. **2000**.
82. Beadle, J. R.; Saunders, J. P.; Wajda, T. J., Jr., Process for Manufacturing Tagatose. **1992**.
83. Ekeberg, D.; Morgenlie, S.; Stenstrom, Y., Base Catalysed Isomerisation of Aldoses of the Arabino and Lyxo Series in the Presence of Aluminate. *Carbohydrate Research*, **2002**, 337, (9), PII S0008-6215(02)00065-4.
84. Oh, D. K., Tagatose: Properties, Applications, and Biotechnological Processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2007**, 76, (1), 1-8.
85. Bertelsen, H.; Eriknauer, K.; Böttcher, K.; Christensen, H. J. S.; Stougaard, P.; Hansen, O. C.; Jørgensen, F., Process for Manufacturing of Tagatose. **2006**.
86. Hansen, O. C.; Jørgensen, F.; Stougaard, P.; Bertelsen, H.; Böttcher, K.; Christensen, H. J. S.; Eriknauer, K., Thermostable Isomerase and Use Hereof, in Particular for Producing Tagatose. **2006**.
87. Ibrahim, O. O.; Spradlin, J. E., Process for Manufacturing D-Tagatose. **2000**.
88. Jørgensen, F.; Hansen, O. C.; Stougaard, P., Enzymatic Conversion of D-Galactose to D-Tagatose: Heterologous Expression and Characterisation of a Thermostable L-Arabinose Isomerase from *Thermoanaerobacter Mathranii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2004**, 64, (6), 816-822.
89. Jung, E. S.; Kim, H. J.; Oh, D. K., Tagatose Production by Immobilized Recombinant *Escherichia Coli* Cells Containing *Geobacillus Stearothermophilus* L-Arabinose Isomerase Mutant in a Packed-Bed Bioreactor. *Biotechnology Progress*, **2005**, 21, (4), 1335-1340.
90. Kim, P., Current Studies on Biological Tagatose Using L-Arabinose Isomerase: A Review and Future Perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2004**, 65, (3), 243-249.
91. Oh, H. J.; Kim, H. J.; Oh, D. K., Increase in D-Tagatose Production Rate by Site-Directed Mutagenesis of L-Arabinose Isomerase from *Geobacillus Thermodenitrificans*. *Biotechnology Letters*, **2006**, 28, (3), 145-149.
92. Pyun, Y. R.; Kim, B. C.; Lee, H. S.; Lee, D. W.; Lee, Y. H., Thermostable L-Arabinose Isomerase and Process for Preparing D-Tagatose. **2005**.
93. Kim, S.-B.; Park, S.-W.; Song, S.-H.; Lee, K.-P.; Kang-Pyo, L.; Oh, D.-K.; Lim, B.-C.; Kim, H.-J., Manufacturing Method of Tagatose Using Galactose Isomerization of High Yield **2008**.
94. De Muynck, C.; Beauprez, J.; Soetaert, W.; Vandamme, E. J., Boric Acid as a Mobile Phase Additive for High Performance Liquid Chromatography Separation of Ribose, Arabinose and Ribulose. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1101, (1-2), 115-121.
95. Yoshihara, K.; Shinohara, Y.; Hirotsu, T.; Izumori, K., Bioconversion of D-Psicose to D-Tagatose and D-Talitol by *Mucoraceae* Fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2006**, 101, (3), 219-222.
96. Kim, H. J.; Hyun, E. K.; Kim, Y. S.; Lee, Y. J.; Oh, D. K., Characterization of an *Agrobacterium Tumefaciens* D-Psicose 3-Epimerase That Converts D-Fructose to D-Psicose. *Applied and Environmental Microbiology*, **2006**, 72, (2), 981-985.
97. Beadle, J. R.; Saunders, J. P.; Wajda, T. J., Process for Manufacturing Tagatose. **1991**.
98. Cummings, J. H.; Roberfroid, M. B.; Andersson, H.; Barth, C.; Ferro-Luzzi, A.; Ghos, Y.; Gibney, M.; Hermons, K.; James, W. P. T.; Korver, O.; Lairon, D.; Pascal, G.; Voragen, A. G. S., A New Look at Dietary Carbohydrate: Chemistry, Physiology and Health. *European Journal of Clinical Nutrition*, **1997**, 51, (7), 417-423.
99. Crittenden, R. G.; Playne, M. J., Production, Properties, and Applications of Food-Grade Oligosaccharides. *Trends Food Sci. Tech*, **1996**, 7, 9.
100. Delzenne, N. M.; Roberfroid, M. B., Physiological Effects of Non-Digestible Oligosaccharides. *Lebens. M. Wiss. a. Technologie*, **1994**, 27, 1-6.
101. Miller, J. N.; Whistler, R. L., Carbohydrates. *Food chemistry*, **2000**, 207.
102. Prenosil, J. E.; Stuker, E.; Bourne, J. R., Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Lactose .1. State of Art. *Biotechnology and Bioengineering*, **1987**, 30, (9), 1019-1025.
103. Engel, L.; Ebrahimi, M.; Czermak, P., Membrane Chromatography Reactor System for the Continuous Synthesis of Galactosyl-Oligosaccharides. *Desalination*, **2008**, 224, 46-51.
104. Jurado, E.; Camacho, F.; Luzón, G.; Vicaria, J. M., Kinetic Models of Activity for Beta-Galactosidases: Influence of Ph, Ionic Concentration and Temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, 34, (1), 33-40.

105. Mahoney, R. R., Galactosyl-Oligosaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: A Review. *Food Chemistry*, **1998**, 63, (2), 147-154.
106. Rustom, I. Y. S.; Foda, M. I.; Lopez-Leiva, M. H., Formation of Oligosaccharides from Whey Uf-Permeate by Enzymatic Hydrolysis - Analysis of Factors. *Food Chemistry*, **1998**, 62, (2), 141-147.
107. Finch, P.; Yoon, J. H., The Effects of Organic Solvents on the Synthesis of Galactose Disaccharides Using Beta-Galactosidases. *Carbohydrate Research*, **1997**, 303, (3), 339-345.
108. Yoon, J. H.; McKenzie, D., A Comparison of the Activities of Three Beta-Galactosidases in Aqueous-Organic Solvent Mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, (4), 439-446.
109. Rudolfova, J.; Curda, L., Galactooligosaccharides as Prebiotics and Their Production from Lactose **2005**.
110. Gaur, R.; Pant, H.; Jain, R.; Khare, S. K., Galacto-Oligosaccharide Synthesis by Immobilized *Aspergillus Oryzae* Beta-Galactosidase. *Food Chemistry*, **2006**, 97, (3), 426-430.
111. Boon, M. A.; Janssen, A. E. M.; van't Riet, K., Effect of Temperature and Enzyme Origin on the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, 26, (2-4), 271-281.
112. Cheng, T. C.; Duan, K. J.; Sheu, D. C., Application of Tris(Hydroxymethyl)Phosphine as a Coupling Agent for Beta-Galactosidase Immobilized on Chitosan to Produce Galactooligosaccharides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2006**, 81, (2), 233-236.
113. Hansson, T.; Adlercreutz, P., Optimization of Galactooligosaccharide Production from Lactose Using Beta-Glycosidases from Hyperthermophiles. *Food Biotechnology*, **2001**, 15, (2), 79-97.
114. Onishi, N.; Tanaka, T., Purification and Properties of a Galacto- and Gluco-Oligosaccharide-Producing β -Glycosidase from *Rhodotorula Minuta* Ifo879. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, 82, (5), 439-443.
115. Planas, A.; Faijes, M., Glycosidases and Glycosynthases in Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. An Overview. *Afinidad*, **2002**, 59, (500), 295-313.
116. Albayrak, N.; Yang, S. T., Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by *Aspergillus Oryzae* Beta-Galactosidase Immobilized on Cotton Cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, **2002**, 77, (1), 8-19.
117. Cardelle-Cobas, A.; Villamiel, M.; Olano, A.; Corzo, N., Study of Galacto-Oligosaccharide Formation from Lactose Using Pectinex Ultra Sp-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2008**, 88, (6), 954-961.
118. Iwasaki, K. I.; Nakajima, M.; Nakao, S. I., Galacto-Oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using Beta-Galactosidase. *Process Biochemistry*, **1996**, 31, (1), 69-76.
119. Yang, S.-T.; Okos, M. R., New Graphical Method for Determining Parameters in Michaelis-Menten-Type Kinetics for Enzymatic Lactose Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **1989**, 34, (6), 763-773.
120. Cheng, C. C.; Yu, M. C.; Cheng, T. C.; Sheu, D. C.; Duan, K. J.; Tai, W. L., Production of High-Content Galacto-Oligosaccharide by Enzyme Catalysis and Fermentation with *Kluyveromyces Marxianus*. *Biotechnology Letters*, **2006**, 28, (11), 793-797.
121. Smart, J. B., Transferase Reactions of the Beta-Galactosidase from *Streptococcus-Thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1991**, 34, (4), 495-501.
122. Lobry de Bruyn, C. A.; van Ekenstein, W. A., Action Des Alcalis Sur Les Sucres, Ii Transformation Réciproque Des Uns Dans Les Autres Des Sucres Glucose, Fructose Et Mannose. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1895**, 14, 203-216.
123. Montilla, A.; del Castillo, M. D.; Sanz, M. L.; Olano, A., Egg Shell as Catalyst of Lactose Isomerisation to Lactulose. *Food Chemistry*, **2005**, 90, (4), 883-890.
124. Hicks, K. B.; Raupp, D. L.; Smith, P. W., Preparation and Purification of Lactulose from Sweet Cheese Whey Ultrafiltrate. *Journal of agricultural & Food Chemistry*, **1984**, 32, 288-292.
125. Hicks, K. B.; Symanski, E. V.; Pfeffer, P. E., Synthesis and High Performance Liquid Chromatography of Maltulose and Cellobiulose. *Carbohydrate Research*, **1983**, 112, 37-50.
126. Carobbi, R.; Innocenti, F., Process for Preparing High-Purity Lactulose Syrup and the Syrup Obtained. 4957564 **1990**.
127. Makras, L.; Van Acker, G.; De Vuyst, L., *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei* 8700:2 Degrades Inulin-Type Fructans Exhibiting Different Degrees of Polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 71, (11), 6531-6537.
128. Rabiou, B. A.; Jay, A. J.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by Beta-Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**, 67, (6), 2526-2530.
129. Borchers, A. T.; Keen, C. L.; Gershwin, M. E., Probiotics and Prebiotics. *Handbook of Nutrition and Immunity*, **2004**, 213-241.

130. Kawakami, K.; Makino, I.; Asahara, T.; Kato, I.; Onoue, M., Dietary Galacto-Oligosaccharides Mixture Can Suppress Serum Phenol and P-Cresol Levels in Rats Fed Tyrosine Diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **2005**, 51, (3), 182-186.
131. Playne, M. J.; Bennett, L. E.; Smithers, G. W., Functional Dairy Foods and Ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, **2003**, 58, (3), 242-264.
132. Rinne, M. M.; Gueimonde, M.; Kalliomaki, M.; Hoppu, U.; Salminen, S. J.; Isolauri, E., Similar Bifidogenic Effects of Prebiotic-Supplemented Partially Hydrolyzed Infant Formula and Breastfeeding on Infant Gut Microbiota. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, **2005**, 43, (1), 59-65.
133. Shin, H. J.; Yang, J. W., Enzymatic Production of Galactooligosaccharide by *Bullera Singularis* Beta-Galactosidase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1998**, 8, (5), 484-489.
134. Boon, M. A.; van't Riet, K.; Janssen, A. E. M., Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Product Removal During a Kinetically Controlled Reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, **2000**, 70, (4), 411-420.
135. Roy, D.; Daoudi, L.; Azaola, A., Optimization of Galacto-Oligosaccharide Production by *Bifidobacterium Infantis* Rw-8120 Using Response Surface Methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2002**, 29, (5), 281-285.
136. Splechtna, B.; Nguyen, T. H.; Steinbock, M.; Kulbe, K. D.; Lorenz, W.; Haltrich, D., Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose Using Beta-Galactosidases from *Lactobacillus Reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, (14), 4999-5006.
137. Tzortzis, G.; Goulas, A. K.; Gibson, G. R., Synthesis of Prebiotic Galactooligosaccharides Using Whole Cells of a Novel Strain, *Bifidobacterium Bifidum* Ncimb 41171. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2005**, 68, (3), 412-416.
138. Knol, J.; Scholtens, P.; Kafka, C.; Steenbakkers, J.; Gross, S.; Helm, K.; Klarczyk, M.; Schopfer, H.; Bockler, H. M.; Wells, J., Colon Microflora in Infants Fed Formula with Galacto- and Fructo-Oligosaccharides: More Like Breast-Fed Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **2005**, 40, (1), 36-42.
139. Kunz, C.; Rudloff, S.; Baier, W.; Klein, N.; Strobel, S., Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annual Review of Nutrition*, **2000**, 20, 699-722.
140. Grizard, D.; Barthomeuf, C., Non-Digestible Oligosaccharides Used as Prebiotic Agents: Mode of Production and Beneficial Effects on Animal and Human Health. *Reproduction Nutrition Development*, **1999**, 39, (5-6), 563-588.
141. Goulas, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., Development of a Process for the Production and Purification of Alpha- and Beta-Galactooligosaccharides from *Bifobacterium Bifidum* Ncimb 41171. *International Dairy Journal*, **2007**, 17, (6), 648-656.
142. Affertsholt-Allen, T., Market Developments and Industry Challenges for Lactose and Lactose Derivatives. *IDF Lactose Symposium*, **2007**.
143. Lifran, E. V.; Hourigan, J. A.; Sleigh, R. W., Lactose Derivatives: Turning Waste into Functional Foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, **2009**, 64, (1), 89-93.
144. Rustom, I. Y. S.; Foda, M. I.; López-Leiva, M. H., Formation of Oligosaccharides from Whey Uf-Permeate by Enzymatic Hydrolysis - Analysis of Factors. *Food Chemistry*, **1998**, 62, (2), 141-147.
145. Mukhopadhyay, M., Extraction and Processing with Supercritical Fluids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2009**, 84, (1), 6-12.
146. Sanders, N., Food Legislation and the Scope for Increased Use of near-Critical Fluid Extraction Operations in the Food, Flavoring and Pharmaceutical Industries. *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents*, **1993**, 37-38.
147. Clifford, A. A., Reactions in Supercritical Fluids. *Supercritical Fluids*, **1994**, 273, 449-479.
148. Temelli, F.; King, J. W.; List, G. R., Conversion of Oils to Monoglycerides by Glycerolysis in Supercritical Carbon Dioxide Media. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **1996**, 73, (6), 699-706.
149. Rizvi, S. S. H.; Yu, Z. R.; Bhaskar, A. R.; Chidambara Raj, C. B., Fundamentals of Processing with Supercritical Fluids. *Ch*, **1994**, 1, 1-26.
150. Walsh, J. M.; Ikonomou, G. D.; Donohue, M. D., Supercritical Phase-Behavior - the Entrainer Effect. *Fluid Phase Equilibria*, **1987**, 33, (3), 295-314.
151. Dohrn, R.; Bunz, A. P., Solubility Enhancement of Carbohydrates in Carbon Dioxide. *ZfL, Internationale Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung - Technologie Marketing, Verpack. Anal.*, **1995**, 46, ((7/8/9)), 5.
152. Moyler, D. A., Extraction of Flavours and Fragrances with Compressed CO₂. *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents*, **1993**, 140-183.
153. Nozzi, N. L.; Singh, R. K., Supercritical Fluids and the Food Industry. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **2002**, 1, 12.

154. Gracia, I.; Rodríguez, J. F.; García, M. T.; Álvarez, A.; García, A., Isolation of Aroma Compounds from Sugar Cane Spirits by Supercritical Co₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, 43, (1), 37-42.
155. Abbasi, H.; Rezaei, K.; Rashidi, L., Extraction of Essential Oils from the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical Co₂. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **2008**, 85, (1), 83-89.
156. Topal, U.; Sasaki, M.; Goto, M.; Hayakawa, K., Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide: Effect of Operating Conditions and Solubility Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, (15), 5604-5610.
157. Fiori, L., Grape Seed Oil Supercritical Extraction Kinetic and Solubility Data: Critical Approach and Modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, 43, 43-54.
158. Vijayan, S.; Byskal, D. P.; Buckley, L. P., Separation of Oil from Fried Chips by a Supercritical Extraction Process: An Overview of Bench-Scale Test Experience and Process Economics. **1994**; p 18.
159. Reverchon, E.; De Marco, I., Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *Journal of Supercritical Fluids*, **2006**, 38, (2), 146-166.
160. Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; Knoll, F. R. N.; Apon, B. M., Supercritical Fluid Extraction for Pesticide Multiresidue Analysis in Honey: Determination by Gas Chromatography with Electron-Capture and Mass Spectrometry Detection. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1048, (2), 153-159.
161. Mohamed, R. S.; Saldana, M. D. A.; Mazzafera, P.; Zetzl, C.; Brunner, G., Extraction of Caffeine, Theobromine, and Cocoa Butter from Brazilian Cocoa Beans Using Supercritical Co₂ and Ethane. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2002**, 41, (26), 6751-6758.
162. Pinelo, M.; Ruiz-Rodríguez, A.; Sineiro, J.; Señoráns, F. J.; Reglero, G.; Núñez, M. J., Supercritical Fluid and Solid-Liquid Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Pomace: A Comparative Study. *European Food Research and Technology*, **2007**, 226, 199-205.
163. Barjaktarovic, B.; Sovilj, M.; Knez, Z., Chemical Composition of Juniperus Communis L. Fruits Supercritical Co₂ Extracts: Dependence on Pressure and Extraction Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, (7), 2630-2636.
164. Rincón, J.; De Lucas, A.; García, M. A.; García, A.; Álvarez, A.; Carnicer, A., Preliminary Study on the Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Nicotine from Tobacco Wastes. *Separation Science and Technology*, **1998**, 33, (3), 411-423.
165. Budich, M.; Brunner, G., Supercritical Fluid Extraction of Ethanol from Aqueous Solutions. *Journal of Supercritical Fluids*, **2003**, 25, (1), PII S0869-8446(02)00091-8.
166. Zekovic, Z.; Pfaf-Sovljanski, I.; Grujic, O., Supercritical Fluid Extraction of Hops. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2007**, 72, (1), 81-87.
167. Kim, W. J.; Kim, J. D.; Oh, S. G., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Caffeine from Korean Green Tea. *Separation Science and Technology*, **2007**, 42, 3229-3242.
168. Gast, K.; Jungfer, M.; Brunner, G., Enrichment of Vitamin E and Provitamin a from Crude Palm Oil by Supercritical Fluid Extraction. *Proceedings of the 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering*, **2001**.
169. Marr, R.; Gamse, T., Use of Supercritical Fluids for Different Processes Including New Developments-a Review. *Chemical Engineering and Processing*, **2000**, 39, 10.
170. Saengcharoenrat, C.; Guyer, D. E., Effects of Supercritical Carbon Dioxide Conditions on Onion Oil Desorption. *Journal of Food Engineering*, **2004**, 63, (1), 33-37.
171. Santoyo, S.; Caverio, S.; Jaime, L.; Ibáñez, E.; Señoráns, F. J.; Reglero, G., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Antimicrobial Activity from *Origanum Vulgare* L.: Determination of Optimal Extraction Parameters. *Journal of Food Protection*, **2006**, 69, (2), 369-375.
172. Santoyo, S.; Caverio, S.; Jaime, L.; Ibáñez, E.; Señoráns, F. J.; Reglero, G., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Rosmarinus Officinalis L. Essential Oil Obtained Via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Food Protection*, **2005**, 68, (4), 790-795.
173. Seger, C.; Rompp, H.; Sturm, S.; Haslinger, E.; Schmidt, P. C.; Hadacek, F., Characterization of Supercritical Fluid Extracts of St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.) by Hplc-Ms and Gc-Ms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2004**, 21, (4), 453-463.
174. Sun, M.; Temelli, F., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Carrot Using Canola Oil as a Continuous Co-Solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, **2006**, 37, (3), 397-408.
175. Vasapollo, G.; Longo, L.; Rescio, L.; Ciurlia, L., Innovative Supercritical Co₂ Extraction of Lycopene from Tomato in the Presence of Vegetable Oil as Co-Solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, **2004**, 29, (1-2), 87-96.

176. Tabera, J.; Guinda, A.; Ruíz-Rodríguez, A.; Señoráns, F. J.; Ibáñez, E.; Albi, T.; Reglero, G., Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, (15), 4774-4779.
177. Vázquez, L.; Torres, C. F.; Fornari, T.; Señoráns, F. J.; Reglero, G., Recovery of Squalene from Vegetable Oil Sources Using Countercurrent Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, 40, (1), 59-66.
178. Perretti, G.; Marconi, O.; Montanari, L.; Fantozzi, P., Rapid Determination of Total Fats and Fat-Soluble Vitamins in Parmigiano Cheese and Salami by Sfe. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, **2004**, 37, (1), 87-92.
179. Cháfer, A.; Pascual-Martí, M. C.; Salvador, A.; Berna, A., Supercritical Fluid Extraction and Hplc Determination of Relevant Polyphenolic Compounds in Grape Skin. *Journal of Separation Science*, **2005**, 28, (16), 2050-2056.
180. Teng, W. Y.; Chen, C. C.; Chung, R. S., Hplc Comparison of Supercritical Fluid Extraction and Solvent Extraction of Coumarins from the Peel of Citrus Maxima Fruit. *Phytochemical Analysis*, **2005**, 16, (6), 459-462.
181. Playne, M. J.; Crittenden, R., Commercially Available Oligosaccharides. *Bull. Int. Dairy Fed.*, **1996**, 313, 10-22.
182. Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajo, J. C., Xylooligosaccharides: Manufacture and Applications. *Trends in Food Science & Technology*, **2000**, 11, (11), 387-393.
183. Goulas, A. K.; Grandison, A. S.; Rastall, R. A., Fractionation of Oligosaccharides by Nanofiltration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**, 83, (7), 675-680.
184. Montañés, F.; Fornari, T.; Martín-Álvarez, P. J.; Corzo, N.; Olano, A.; Ibáñez, E., Selective Recovery of Tagatose from Mixtures with Galactose by Direct Extraction with Supercritical Co₂ and Different Cosolvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, (21), 8340-8345.
185. Montañés, F.; Fornari, T.; Martín-Álvarez, P. J.; Montilla, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Ibáñez, E., Selective Fractionation of Disaccharide Mixtures by Supercritical Co₂ with Ethanol as Co-Solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, 41, (1), 61-67.
186. Bracey, W.; Akman, U.; Sunol, A. K., High-Pressure Adsorption of Aqueous Fructose Glucose Mixtures on an Activated Carbon and Their Supercritical Desorption. *Advances in Separation Processes*, **1990**, 118, 187-201.
187. Macedo, E. A., Solubility of Amino Acids, Sugars, and Proteins. *Pure and Applied Chemistry*, **2005**, 77, (3), 559-568.
188. Leontarakis, G.; Tsavas, P.; Voutsas, E.; Magoulas, K.; Tassios, D., Experimental and Predicted Results of Anomeric Equilibrium of Glucose in Alcohols. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2005**, 50, (6), 1924-1927.
189. Macedo, E. A.; Peres, A. M., Thermodynamics of Ternary Mixtures Containing Sugars. SLE of D-Fructose in Pure and Mixed Solvents. Comparison between Modified Uniquac and Modified Unifac. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2001**, 40, (21), 4633-4640.
190. Machado, J. J. B.; Coutinho, J. A.; Macedo, E. A., Solid-Liquid Equilibrium of Alpha-Lactose in Ethanol/Water. *Fluid Phase Equilibria*, **2000**, 173, (1), 121-134.
191. Peres, A. M.; Macedo, E. A., Measurement and Modeling of Solubilities of D-Glucose in Water/Alcohol and Alcohol/Alcohol Systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1997**, 36, (7), 2816-2820.
192. Peres, A. M.; Macedo, E. A., Phase Equilibria of D-Glucose and Sucrose in Mixed Solvent Mixtures: Comparison of Uniquac-Based Models. *Carbohydrate Research*, **1997**, 303, (2), 135-151.
193. Reber, L. A., The Solubility of Sucrose in Hydroalcoholic Solutions. *Journal of the American Pharmaceutical Association-Scientific Edition*, **1953**, 42, (4), 192-193.
194. Gabas, N.; Carillon, T.; Hiquily, N., Solubilities of D-Xylose and D-Mannose in Water Ethanol Mixtures at 25-Degrees-C. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **1988**, 33, (2), 128-130.
195. Bockstanz, G. L.; Buffa, M.; Lira, C. T., Solubilities of Alpha-Anhydrous Glucose in Ethanol Water Mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **1989**, 34, (4), 426-429.
196. Kelly, F. H. C., The Solubility of Sucrose in Impure Solutions. *Principles of Sugar Technology*, **1959**, 2.
197. Gabas, N.; Laguerie, C., Solubility Diagram for the Ternary-System Water - D-Xylose - D-Mannose - Prediction Model of Liquid Solid Equilibrium by the Unifac Method. *Bulletin De La Societe Chimique De France*, **1990**, (3), 391-395.
198. Flood, A. E.; Johns, M. R.; White, E. T., Mutarotation of D-Fructose in Aqueous-Ethanol Solutions and Its Influence on Crystallisation. *Carbohydrate Research*, **1996**, 288, 45-56.
199. Data., I. S. o. S. a. E., In **2004**.
200. Flood, A. E.; Puagsa, S., Refractive Index, Viscosity, and Solubility at 30 Degrees C, and Density at 25 Degrees C for the System Fructose Plus Glucose Plus Ethanol Plus Water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2000**, 45, (5), 902-907.

201. Peres, A. M.; Macedo, E. A., A Modified Unifac Model for the Calculation of Thermodynamic Properties of Aqueous and Non-Aqueous Solutions Containing Sugars. *Fluid Phase Equilibria*, **1997**, 139, (1-2), 47-74.
202. Leschke, R. J., Techniques for Estimating the Vapor-Liquid-Equilibrium of Sugar Solutions. *Biotechnology Progress*, **1987**, 3, (4), 205-211.
203. Kononenko, O. K.; Herstein, K. M., Nonaqueous Solvents for Sucrose. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **1956**, 1, (1), 87-92.
204. Vasatko, J.; Smelik, A., Solubility of Anhydrous Beta-D-Fructose in Water. *Chemické Zvesti*, **1967**, 21, (9-10), 736-738.
205. Achard, C.; Gros, J. B.; Dussap, C. G., Prédiction De L'activité De L'eau, Des Températures D'ébullition Et De Congélation De Solutions Aqueuses De Sucres Par Un Modèle Unifac. *Cahier Scientifique*, **1992**, 109, (MARCH), 93-101.
206. Catta, M.; Dussap, C. G.; Gros, J. B., A Physical Chemical Unifac Model for Aqueous Solutions of Sugars. *Fluid Phase Equilibria*, **1995**, 105, (1), 1-25.
207. Ferreira, O.; Brignole, E. A.; Macedo, E. A., Phase Equilibria in Sugar Solutions Using the a-Unifac Model. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2003**, 42, (24), 6212-6222.
208. Le Maguer, M., Thermodynamics and Vapor-Liquid Equilibria. *Physical Chemistry of Foods*, **1992**, 1-45.
209. Peres, A. M.; Macedo, E. A., Thermodynamic Properties of Sugars in Aqueous Solutions: Correlation and Prediction Using a Modified Uniquac Model. *Fluid Phase Equilibria*, **1996**, 123, (1-2), 71-95.
210. Spiliotis, N., *Recovery and Purification of Sugar Fatty Esters Produced Through Enzymatic Esterification*, **2000**.
211. Spiliotis, N.; Tassios, D., A Unifac Model for Phase Equilibrium Calculations in Aqueous and Nonaqueous Sugar Solutions. *Fluid Phase Equilibria*, **2000**, 173, (1), 39-55.
212. Lewis, G. N., The Osmotic Pressure of Concentrated Solutions, and the Laws of the Perfect Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1908**, 30, (5), 668-683.
213. Abrams, D. S.; Prausnitz, J. M., Statistical Thermodynamics of Liquid-Mixtures - New Expression for Excess Gibbs Energy of Partly or Completely Miscible Systems. *Aiche Journal*, **1975**, 21, (1), 116-128.
214. Van Ness, H. C.; Smith, J. M.; Abbott, M. M., *Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics*, **2004**, (7).
215. Wertheim, M. S., Fluids with Highly Directional Attractive Forces .1. Statistical Thermodynamics. *Journal of Statistical Physics*, **1984**, 35, (1-2), 19-34.
216. Redlich, O.; Kwong, J. N. S., On the Thermodynamics of Solutions. V: An Equation of State. Fugacities of Gaseous Solutions. *Chemical Reviews*, **1949**, 44, (1), 233-244.
217. Peng, D.; Robinson, D. B., New 2-Constant Equation of State. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, **1976**, 15, (1), 59-64.
218. Soave, G., Equilibrium Constants from a Modified Redlich-Kwong Equation of State. *Chemical Engineering Science*, **1972**, 27, (6), 1197-&.
219. Mathias, P. M.; Copeman, T. W., Extension of the Peng-Robinson Equation of State to Complex Mixtures: Evaluation of the Various Forms of the Local Composition Concept. *Fluid Phase Equilibria*, **1983**, 13, (C), 91-108.
220. Aim, K.; Fermeglia, M., *The Experimental Determination of Solubilities*, **2003**, 493-555.
221. Dohrn, R.; Brunner, G., High-Pressure Fluid-Phase Equilibria - Experimental Methods and Systems Investigated (1988-1993). *Fluid Phase Equilibria*, **1995**, 106, (1-2), 213-282.
222. Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Villamiel, M., Optimization of Conditions for Galactooligosaccharide Synthesis During Lactose Hydrolysis by Beta-Galactosidase from *Kluyveromyces Lactis* (Lactozym 3000 L Hp G). *Food Chemistry*, **2008**, 107, (1), 258-264.
223. Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Villamiel, M.; Olano, A., Isomerization of Lactose-Derived Oligosaccharides: A Case Study Using Sodium Aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, (22), 10954-10959.
224. Ibáñez, E.; Oca, A.; de Murga, G.; López-Sebastián, S.; Tabera, J.; Reglero, G., Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, (4), 1400-1404.
225. Martínez-Castro, I.; Olano, A., Influence of Thermal-Processing on Carbohydrate-Composition of Milk - Formation of Epilactose. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **1980**, 35, (1), 5-8.
226. Cockman, M.; Kubler, D. G.; Oswald, A. S.; Wilson, L., The Mutarotation of Fructose and the Invertase Hydrolysis of Sucrose. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **1987**, 6, (2), 181-201.
227. Sanz, M. L.; Sanz, J.; Martínez-Castro, I., Characterization of O-Trimethylsilyl Oximes of Disaccharides by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia*, **2002**, 56, (9-10), 617-622.

228. Brobst, K. M.; Lott, C. E., Determination of Some Components in Corn Syrup by Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives. *Cereal Chemistry*, **1966**, 43, (1), 35-43.
229. Baños, J. L. G.; Olano, A.; Corzo, N., Determination of Mono and Disaccharide Content of Enteral Formulations by Gas Chromatography. *Chromatographia*, **2000**, 52, (3-4), 221-224.
230. Li, B. W.; Schuhmann, P. J., Gas-Chromatographic Analysis of Sugars in Granola Cereals. *Journal of Food Science*, **1981**, 46, (2), 425-427.
231. Montilla, A.; Moreno, F. J.; Olano, A., A Reliable Gas Capillary Chromatographic Determination of Lactulose in Dairy Samples. *Chromatographia*, **2005**, 62, (5-6), 311-314.
232. Jain, A.; Yang, G.; Yalkowsky, S. H., Estimation of Melting Points of Organic Compounds. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2004**, 43, (23), 7618-7621.
233. Valtz, A.; Teodorescu, M.; Wichterle, I.; Richon, D., Liquid Densities and Excess Molar Volumes for Water Plus Diethylene Glycolamine, and Water, Methanol, Ethanol, 1-Propanol + Triethylene Glycol Binary Systems at Atmospheric Pressure and Temperatures in the Range of 283.15-363.15 K. *Fluid Phase Equilibria*, **2004**, 215, (2), 129-142.
234. Bertakis, E.; Lemonis, I.; Katsoufis, S.; Voutsas, E.; Dohrn, R.; Magoulas, K.; Tassios, D., Measurement and Thermodynamic Modeling of Solid-Liquid-Gas Equilibrium of Some Organic Compounds in the Presence of CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, 41, (2), 238-245.
235. Diefenbacher, A.; Turk, M., Phase Equilibria of Organic Solid Solutes and Supercritical Fluids with Respect to the Ress Process. *Journal of Supercritical Fluids*, **2002**, 22, (3), PII S0896-8446(01)00123-1.
236. García, D. C.; Luks, K. D., Patterns of Solid-Fluid Phase Equilibria: New Possibilities? *Fluid Phase Equilibria*, **1999**, 161, (1), 91-106.
237. Kikic, I.; Lora, M.; Bertucco, A., A Thermodynamic Analysis of Three-Phase Equilibria in Binary and Ternary Systems for Applications in Rapid Expansion of a Supercritical Solution (RESS), Particles from Gas-Saturated Solutions (PGSS), and Supercritical Antisolvent (SAS). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1997**, 36, (12), 5507-5515.
238. Prausnitz, J. M.; Lichtenthaler, R. N.; De Azevedo, E. G., *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 3rd Edit., **1999**, 507-575.
239. Dahl, S.; Michelsen, M. L., High-Pressure Vapor-Liquid-Equilibrium with a Unifac-Based Equation of State. *Aiche Journal*, **1990**, 36, (12), 1829-1836.
240. Tsavas, P.; Voutsas, E.; Magoulas, K.; Tassios, D., Phase Equilibrium Calculations in Aqueous and Nonaqueous Mixtures of Sugars and Sugar Derivatives with a Group-Contribution Model. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2004**, 43, (26), 8391-8399.
241. Larsen, B. L.; Rasmussen, P.; Fredenslund, A., A Modified Unifac Group-Contribution Model for Prediction of Phase-Equilibria and Heats of Mixing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1987**, 26, (11), 2274-2286.
242. Yau, J. S.; Tsai, F. N., Solubilities of D(-)-Fructose and D(+)-Glucose in Subcritical and Supercritical Carbon-Dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, **1994**, 7, (2), 129-133.
243. Raemy, A.; Schweizer, T. F., Thermal-Behavior of Carbohydrates Studied by Heat-Flow Calorimetry. *Journal of Thermal Analysis*, **1983**, 28, (1), 95-108.
244. Roos, Y. H., Melting and Glass Transitions of Low Molecular Weight Carbohydrates. *Carbohydrate Research*, **1993**, 238, 39-48.
245. Fornari, T.; Cháfer, A.; Stateva, R. P.; Reglero, G., A New Development in the Application of the Group Contribution Associating Equation of State to Model Solid Solubilities of Phenolic Compounds in Sc-CO₂. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2005**, 44, (21), 8147-8156.
246. Goodman, B. T.; Wilding, W. V.; Oscarson, J. L.; Rowley, R. L., A Note on the Relationship between Organic Solid Density and Liquid Density at the Triple Point. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2004**, 49, (6), 1512-1514.
247. St Cholakov, G.; Wakeham, W. A.; Stateva, R. P., Estimation of Normal Boiling Points of Hydrocarbons from Descriptors of Molecular Structure. *Fluid Phase Equilibria*, **1999**, 163, (1), 21-42.
248. Wakeham, W. A.; St Cholakov, G.; Stateva, R. P., Liquid Density and Critical Properties of Hydrocarbons Estimated from Molecular Structure. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2002**, 47, (3), DOI 10.1021/jc010308l|UNSP JE010308L.
249. Miller, D. P.; de Pablo, J. J., Calorimetric Solution Properties of Simple Saccharides and Their Significance for the Stabilization of Biological Structure and Function. *Journal of Physical Chemistry B*, **2000**, 104, (37), 8876-8883.
250. Dahl, S.; Fredenslund, A.; Rasmussen, P., The Mhv2 Model - a Unifac-Based Equation of State Model for Prediction of Gas Solubility and Vapor-Liquid-Equilibria at Low and High-Pressures. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1991**, 30, (8), 1936-1945.

251. Dohrn, R.; Bünz, A. P., Solubility Enhancement of Carbohydrates in Carbon Dioxide. *ZFL, Intern. Zeits. Lebensm.-Tech. Marketing, Verpack.Anal.*, **1995**, 46, (7/8), 3.
252. Bünz, A. P.; Zitko-Stemberger, N.; Dohrn, R., Phase-Equilibria of Ternary and Quaternary Systems Containing Carbon-Dioxide, Water, Isopropanol, and Glucose. *Journal of Supercritical Fluids*, **1994**, 7, (1), 43-50.
253. Eckhart, P. F.; Timmermans, E., *Bulletin IDF*, **1996**, 59-64.
254. Crittenden, R. G.; Playne, M. J., Purification of Food-Grade Oligosaccharides Using Immobilised Cells of *Zymomonas Mobilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2002**, 58, (3), 297-302.
255. Ruiz-Matute, A. I.; Ramos, L.; Martínez-Castro, I.; Sanz, M. L., Fractionation of Honey Carbohydrates Using Pressurized Liquid Extraction with Activated Charcoal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, (18), 8309-8313.
256. Montañés, F.; Corzo, N.; Olano, A.; Reglero, G.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Selective Fractionation of Carbohydrate Complex Mixtures by Supercritical Extraction with Co₂ and Different Co-Solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, **2008**, 45, (2), 189-194.
257. Montañés, F.; Olano, A.; Reglero, G.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Supercritical Technology as an Alternative to Fractionate Prebiotic Galactooligosaccharides. *Separation and Purification Technology*, **2009**, 66, 383-389.
258. EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a Request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Boron (Sodium Borate and Boric Acid). In **2004**; p 22.
259. De Moraes, E. B.; Torres Alvarez, M. E.; Wolf Maciel, M. R.; Filho, R. M., Simulation and Optimization of a Supercritical Extraction Process for Recovering Provitamin A. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2006**, 129-132, 1041-1050.
260. Gracia, I.; Garcia, M. T.; Rodriguez, J. F.; Fernandez, M. P.; de Lucas, A., Modelling of the Phase Behaviour for Vegetable Oils at Supercritical Conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, **2009**, 48, (3), 189-194.
261. Lim, C. S.; Manan, Z. A.; Sarmidi, M. R., Simulation Modeling of the Phase Behavior of Palm Oil-Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **2003**, 80, (11), 1147-1156.
262. Manan, Z. A.; Siang, L. C.; Mustapa, A. N., Development of a New Process for Palm Oil Refining Based on Supercritical Fluid Extraction Technology. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2009**, 48, (11), 5420-5426.
263. Mendes, M. F.; Uller, A. M. C.; Pessoa, F. L. P., Simulation and Thermodynamic Modeling of the Extraction of Tocopherol from a Synthetic Mixture of Tocopherol, Squalene and Co₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2000**, 17, (4-7), 761-769.
264. Fredenslund, A.; Jones, R. L.; Prausnitz, J. M., Group-Contribution Estimation of Activity-Coefficients in Nonideal Liquid-Mixtures. *Aiche Journal*, **1975**, 21, (6), 1086-1099.
265. Mengarelli, A. C.; Brignole, E. A.; Bottini, S. B., Activity Coefficients of Associating Mixtures by Group Contribution. *Fluid Phase Equilibria*, **1999**, 163, (2), 195-207.
266. Huron, M. J.; Vidal, J., New Mixing Rules in Simple Equations of State for Representing Vapor-Liquid-Equilibria of Strongly Non-Ideal Mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, **1979**, 3, (4), 255-271.
267. Wong, D. S. H.; Orbey, H.; Sandler, S. I., Equation of State Mixing Rule for Nonideal Mixtures Using Available Activity-Coefficient Model Parameters and That Allows Extrapolation over Large Ranges of Temperature and Pressure. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1992**, 31, (8), 2033-2039.
268. Wong, D. S. H.; Sandler, S. I., A Theoretically Correct Mixing Rule for Cubic Equations of State. *Aiche Journal*, **1992**, 38, (5), 671-680.

Capítulo VI: Anexos

6. ANEXOS

6.1. Anexo 1. Marco teórico para el modelado termodinámico de solubilidades a presión atmosférica

La expresión general para el coeficiente de actividad de un componente I es:

$$\gamma_i = \gamma_i^{comb} \gamma_i^{res} \gamma_i^{assoc} \quad (\text{Ecuación VI-1})$$

En esta expresión, las contribuciones combinatorias (*comb*) y residuales (*res*) provienen del modelo UNIFAC original (264), y el término asociación (*assoc*) se obtienen a partir de una expresión para la energía residual de Helmholtz (265), como función de la fracción de los sitios no asociados en la solución y en el componente puro i .

La expresión más sencilla corresponde a mezclas donde solamente hay un grupo de asociación con dos sitios de asociación. En este estudio hemos asumido que los efectos de asociación correspondientes al anillo OH del azúcar son idénticos a los del grupo OH presentes en el agua y en los alcoholes. Por tanto, en estas soluciones habrá un solo grupo de asociación con una fuerza de asociación Δ_{OH} caracterizada por los parámetros de energía ε_{OH} y volumen κ_{OH} :

$$\Delta_{OH} = \kappa_{OH} [\exp(\varepsilon_{OH} / kT) - 1] \quad (\text{Ecuación VI-2})$$

Asumiendo lo anterior, la contribución de asociación al coeficiente de actividad del azúcar (componente i) en mezclas azúcar-alcohol-agua viene dado por:

$$\ln \gamma_i^{assoc} = \nu^{OH,i} \left[2 \ln \frac{X_{OH}}{X_{OH,i}} + (X_{OH,i} - X_{OH}) \right] - (1 - X_{OH}) (\nu^{OH,i} - r_i \rho_{OH}) \quad (\text{Ecuación VI-3})$$

donde $\nu^{OH,i}$ es el número de grupos de asociación presentes en el componente i . Las fracciones de los sitios no asociados en la mezcla (X_{OH}) y en el componente puro i ($X_{OH,i}$) vienen dadas por:

$$X_{OH} = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4\rho_{OH}\Delta_{OH}}}{2\rho_{OH}\Delta_{OH}}$$

$$X_{OH,i} = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4(\rho_{OH})_i\Delta_{OH}}}{2(\rho_{OH})_i\Delta_{OH}}$$

donde ρ_{OH} y $\rho_{OH,i}$ son respectivamente la densidad del grupo asociativo OH en la solución y en el componente puro i , dado por:

$$\rho_{OH} = \frac{\sum_{i=1}^{NC} \nu^{OH,i} x_i}{\sum_{i=1}^{NC} r_i x_i}$$

$$(\rho_{OH})_i = v^{OH,i} / r_i$$

x_i es la fracción molar del componente i en la mezcla y r_i es su volumen molecular obtenido por los parámetros de volumen del grupo UNIFAC.

6.2. Anexo 2. Marco teórico para el modelado termodinámico de solubilidades en condiciones supercríticas

6.2.1. Extensión de las EdE a mezclas: reglas de mezclado

La extensión de las EdE a mezclas requiere establecer un procedimiento para obtener los parámetros a y b de la mezcla. Las reglas de mezclado clásicas siguen la teoría de un fluido de VdW en la que una mezcla se considera como un fluido hipotético puro cuyo tamaño molecular y energía potencial son promedios de la composición de los tamaños y energías característicos de los componentes de la mezcla:

$$a_{ij} = (1 - k_{ij}) \sqrt{a_{ii} a_{jj}} \quad (\text{regla cuadrática}) \quad (\text{Ecuación VI-4})$$

$$b_{ij} = \frac{b_i + b_j}{2} (1 - l_{ij}) \quad (\text{regla geométrica}) \quad (\text{Ecuación VI-5})$$

En el cálculo de a y b se introducen dos coeficientes de interacción binaria entre los componentes i y j (k_{ij} y l_{ij}) como parámetros ajustables, incrementando la capacidad del modelo de describir el equilibrio líquido-vapor. Sin embargo, esto no es suficiente para la representación del equilibrio de mezclas de compuestos polares, o diferentes en tamaño y naturaleza química. Al igual que en las EdE, han surgido diferentes reglas de mezclado que superan las anteriores limitaciones.

Otras posibles reglas de mezclado son los planteamientos de Huron y Vidal (266) o las de Wong y Sandler (267, 268) entre otras. Ambos planteamientos intentan mejorar la las reglas de mezclado incorporando expresiones usadas para explicar la dependencia de la composición de la energía de exceso de Gibbs de las mezclas de líquidos.

6.2.2. Modelado del equilibrio sólido-líquido-gas en SCCO_2 aplicando un modelo que combina una EdE con un modelo de coeficiente de actividad para las reglas de mezclado

6.2.2.1. Función exceso de una EdE

Las bases de todos los métodos que emplean un modelo de coeficiente de actividad en una EdE es una expresión para el exceso de la energía libre de Helmholtz de la mezcla a la temperatura y presión dada. Esta cantidad puede ser definida como la diferencia entre la

energía libre molar de Helmholtz de la mezcla y la de una mezcla ideal teniendo la misma temperatura, presión y composición.

$$A_m^E = A_m(T, V_m, x_1, x_2, \dots, x_n) - \sum_i x_i [A_i^*(T, V_i^*) + RT \ln x_i] \quad (\text{Ecuación VI-6})$$

Donde A_m es la energía libre molar de Helmholtz de la mezcla en las condiciones dadas y A_i^* es la energía libre molar de Helmholtz del componente puro i a la misma temperatura, pero a diferente volumen. Para que esta expresión esté de acuerdo con la definición de la energía libre de Helmholtz exceso de la mezcla a presión constante, los volúmenes molares V_m and V_i^* serán los obtenidos resolviendo la EdE (para la mezcla y para el componente puro) a la presión P . La energía libre de Gibbs exceso de la mezcla se obtiene:

$$G_m^E = A_m^E + PV_m^E = A_m^E + P \left(V_m - \sum_i x_i V_i^* \right) \quad (\text{Ecuación VI-7})$$

V_m^E es el volumen molar exceso de la mezcla. La expresión para el cálculo de la energía libre de Gibbs exceso a partir de una EdE viene dada por:

$$\begin{aligned} G_m^E / RT = & \sum_i x_i \ln \left(\frac{V_i^* - b_i}{V_m - b} \right) - \left(\frac{a / bRT}{c_1 - c_2} \right) \ln \left(\frac{V_m + c_1 b}{V_m + c_2 b} \right) + \\ & + \sum_i x_i \left(\frac{a_i / b_i RT}{c_1 - c_2} \right) \ln \left(\frac{V_i^* + c_1 b_i}{V_i^* + c_2 b_i} \right) + \left(\frac{PV_m^E}{RT} \right) \end{aligned} \quad (\text{Ecuación VI-8})$$

donde a y b están referidos a la mezcla.

6.2.2.2. Método Huron-Vidal (HV)

Para ir más allá es necesario resolver la EdE para los volúmenes molares que aparecen en la ecuación VI-8. Para simplificar el problema Huron y Vidal eligieron un caso especial cuando P tiende a infinito, el cual corresponde a $V_m = b$ y $V_i^* = b_i$. Esto lleva a:

$$G_m^E / RT = \left(-\alpha + \sum_i x_i \alpha_i \right) \left(\frac{1}{c_1 - c_2} \right) \ln \left(\frac{1 + c_1}{1 + c_2} \right) + \left(\frac{PV_m^E}{RT} \right) \quad (\text{Ecuación VI-9})$$

donde

$$\alpha = (a / RTb) \text{ y } \alpha_i = (a_i / RTb_i) \quad (\text{Ecuación VI-10 a})$$

se asume que:

$$b_{\text{mezcla}} = \sum_{i=1}^{N_c} x_i b_{ii} \quad (\text{Ecuación VI-10 b})$$

donde V_m^E tiende a cero y $(P V_m^E)$ también tiende a cero cuando la P tiende a infinito. Por lo tanto, incluyendo la expresión para el exceso de energía de Gibbs y estableciendo que $(P V_m^E) = 0$, la ecuación VI-10 puede resolverse para obtener el parámetro α de la mezcla como función de la composición. El método HV es válido en combinación con otros modelos como NRTL, pero solamente cuando los parámetros están referidos a valores binarios del equilibrio líquido-vapor. Wong y Sandler siguieron un planteamiento similar, pero una regla de mezclado diferente para b .

6.2.2.3. Métodos de presión cero

Muchos investigadores han adoptado una presión de referencia cero que hace desaparecer otra vez el término $(P V_m^E)$ y reduce la solución a la siguiente ecuación no lineal:

$$q(\alpha) = (G_m^E / RT) + \sum_i x_i [q(\alpha_i) - \ln(b_i / b)] \quad (\text{Ecuación VI-11})$$

donde:

$$q(\alpha) = -1 - \ln\left(\frac{1-u}{u}\right) - \left(\frac{\alpha}{c_1 - c_2}\right) \ln\left(\frac{1+c_1 u}{1+c_2 u}\right) \quad (\text{Ecuación VI-12})$$

y $u = b / V_m^L$ y V_m^L es la raíz de la EdE a presión cero. La misma fórmula se aplica para determinar $q(\alpha)$ para cada componente.

Una vez elegido un modelo para la energía de Gibbs exceso y una regla de combinación para b , todos los términos del lado derecho de la ecuación VI-11 son conocidos y sólo queda resolver la ecuación VI-12 para α . Esto se puede conseguir tomando la solución de la ecuación $PV_m^E = 0$:

$$\alpha = \frac{(1+c_1 u)(1+c_2 u)}{u(1-u)} \quad (\text{Ecuación VI-13})$$

La ecuación VI-12 también se puede resolver para u y luego obtener α de la ecuación VI-13.

Las predicciones de equilibrio vapor-líquido basadas en el uso de EdE con reglas de mezclado que utilizan modelos de coeficiente de actividad ha demostrado su validez, comparados con los modelos de EdE con reglas de mezclado clásicas. Sin embargo, este

método está limitado al rango de temperaturas dentro del cual el modelo de coeficiente de actividad es válido. Asimismo, una dificultad fundamental surge al resolver la raíz de la EdE a presión cero: por debajo de ciertos valores de α , la ecuación $P(V)=0$ no tiene raíz real. Se han propuesto varios procedimientos para simplificar la aplicación del método y extender el rango de temperaturas por encima de las cuales la ecuación de presión cero puede resolverse.

Uno de estos procedimientos es el propuesto por Dahl y Michelsen (239), el conocido como método MHV2 (método de Huron-Vidal de segundo orden), en el cual la ecuación VI-12 es sustituida por la siguiente ecuación polinomial:

$$q(\alpha) = q_0 + q_1\alpha + q_2\alpha^2 \quad (\text{Ecuación VI-14})$$

Los coeficientes de esta expresión polinomial han sido determinados ajustando los resultados obtenidos en la ecuación VI-13 en su rango de validez. Los valores recomendados de q_1 y q_2 son -0.478 and -0.0047, respectivamente para la ecuación de SRK ($c_1=1$; $c_2=0$). Wong y Sandler (268) propusieron -0.4347 y -0.003654 para las ecuaciones del tipo para las cuales $c_1 = c_2 = 1 \pm \sqrt{2}$.

En el modelo MHV2 la expresión para las reglas de mezclado viene dada por:

$$q_1 \left(\alpha_{\text{mezcla}} - \sum_{i=1}^N z_i \alpha_{ii} \right) + q_2 \left(\alpha_{\text{mezcla}}^2 - \sum_{i=1}^N z_i \alpha_{ii}^2 \right) = \frac{g^{\text{E}*}}{RT} + \sum_{i=1}^N z_i \ln \left(\frac{b_{\text{mezcla}}}{b_{ii}} \right) \quad (\text{Ecuación VI-15})$$

donde $g^{\text{E}*}$ es una expresión independiente para la energía de Gibbs exceso.

La expresión para el coeficiente de fugacidad derivado de la regla de mezclado de MHV2 es:

$$\ln \phi_i = \ln \left[\frac{RT}{P(v-b)} \right] + \left[\frac{1}{v-b} - \frac{\alpha_{\text{mezcla}}}{v+b} \right] b_{ii} - \ln \left(\frac{v+b}{v} \right) \left[\frac{\partial(n\alpha_{\text{mezcla}})}{\partial n_i} \right]_{T, n_j} \quad (\text{Ecuación VI-16})$$

La derivada $\left[\frac{\partial(n\alpha_{\text{mezcla}})}{\partial n_i} \right]$ puede calcularse a partir de la regla de mezclado de MHV2, usando:

$$(q_1 + 2\alpha q_2) \frac{\partial(n\alpha_{\text{mezcla}})}{\partial n_i} = q_1 \alpha_{ii} + q_2 (\alpha_{\text{mezcla}}^2 + \alpha_{ii}^2) + \ln \gamma_i + \ln \frac{b_{\text{mezcla}}}{b_{ii}} + \frac{b_{ii}}{b_{\text{mezcla}}} - 1 \quad (\text{Ecuación VI-17})$$

Donde $\ln \gamma_i$ es el coeficiente de actividad del componente i calculado de la expresión adoptada para la energía de Gibbs exceso.

Utilizando las reglas de mezclado MHV2, se puede combinar una EdE con un modelo de coeficientes de actividad (por ejemplo, UNIFAC) lo que resulta en una herramienta predictiva útil para modelar el comportamiento de las fases de sistemas complejos en un amplio rango de presiones.

6.3. Anexo 3. Isomerización de GOS con aluminato sódico y ácido bórico

Tabla VI-1. Isomerización de GOS con aluminato sódico y ácido bórico

Síntesis GOS	Relación molar aluminato sódico/carbohidrato	Tiempo isomerización GOS	Total carbohidratos (%)	%M totales	%M N Is	%M Is	%D totales	%La	%Lu	%Otros D N Is	%Otros D Is	%T totales	%T N Is	%T Is
Composición después síntesis enzimática GOS				36.88	36.88	0.00	47.12	21.36	0.00	25.76	0.00	16.00	16.00	0.00
SE1	1:1	2 horas	95.1	35.21	30.02	5.19	48.29	12.42	8.94	23.55	3.38	16.5	15.49	1.01
SE1	1:1	4 horas	88.3	37.03	26.75	10.28	45.95	7.37	14.61	18.07	5.9	17.02	14.69	2.33
SE1	1:1	6 horas	85.7	38.82	23.84	14.98	44.1	3.86	16.54	17.36	6.33	17.08	13.83	3.25
SE1	1:1	8 horas	84.2	35.91	18.21	17.7	45.23	2.39	18.94	15.62	8.28	18.86	13.72	5.14
SE1	1:1	10 horas	77.8	31.31	15.66	15.65	49.58	0.59	23.92	16.15	8.91	19.11	14.25	4.86
SE1	2:1	2 horas	97.7	33.16	23.94	9.22	50.94	12.95	9.58	22.98	5.43	15.9	14.23	1.67
SE1	2:1	4 horas	94.4	30.89	16.16	14.73	52.57	8.12	16.87	19.29	8.29	16.54	12.90	3.64
SE1	2:1	6 horas	89.2	30.63	12.04	18.59	52.8	4.45	20.15	17.98	10.22	16.57	12.12	4.45
SE1	2:1	8 horas	87.7	28.74	9.56	19.18	53.07	2.8	22.22	18.31	9.74	18.19	11.71	6.48
SE1	2:1	10 horas	81.5	26.32	7.30	19.02	54.62	0.65	26.35	16.27	11.34	18.9	12.74	6.16
Composición después síntesis enzimática GOS				61.19	61.19	0.00	25.94	12.19	0.00	13.75	0.00	12.87	12.87	0.00
SE2	1:1	2 horas	97.0	58.29	51.59	6.70	26.54	9.96	2.69	10.66	3.23	15.17	14.25	0.92
SE2	1:1	4 horas	90.1	59.11	44.79	14.32	24.34	6.19	4.58	8.24	5.34	16.55	14.51	2.04
SE2	1:1	6 horas	87.3	59.61	40.46	19.15	23.68	4.99	6.56	5.14	7.00	16.71	13.64	3.07

SE2	1:1	8 horas	86.0	57.70	33.44	24.26	24.77	3.10	8.68	4.88	8.11	17.53	12.55	4.98
SE2	1:1	10 horas	80.9	53.12	28.2	24.92	28.96	3.13	12.10	5.70	8.03	17.92	13.14	4.78
SE2	2:1	2 horas	97.2	57.33	42.17	15.16	29.13	7.40	5.48	10.65	5.60	13.54	11.92	1.62
SE2	2:1	4 horas	90.2	55.04	31.82	23.22	30.89	6.50	8.56	7.28	8.55	14.07	10.71	3.36
SE2	2:1	6 horas	89.1	53.29	25.52	27.77	31.44	4.86	10.09	5.9	10.59	15.27	11.04	4.23
SE2	2:1	8 horas	88.4	50.64	23.92	26.72	32.78	3.33	12.06	7.07	10.33	16.58	10.81	5.77
SE2	2:1	10 horas	80.3	49.01	22.72	26.29	33.73	2.85	13.20	6.00	11.69	17.26	11.68	5.58
Síntesis GOS	Relación molar ácido bórico/carbohidrato	Tiempo isomerización GOS	Total carbohidratos (%)	%M totales	%M N Is	%M Is	%D totales	%La	%Lu	%Otros D N Is	%Otros D Is	%T totales	%T N Is	%T Is
Composición después síntesis enzimática GOS				36.88	36.88	0.00	47.12	21.36	0.00	25.76	0.00	16.00	16.00	0.00
SE1	1:1	60 minutos	96.6	37.25	29.28	7.97	45.88	14.78	6.50	21.55	3.06	16.87	15.64	1.23
SE1	1:1	90 minutos	92.4	38.01	27.70	10.31	44.06	7.58	12.72	18.64	5.12	17.93	15.12	2.81
SE1	1:1	120 minutos	85.9	39.55	24.71	14.84	43.03	4.42	14.76	17.87	5.98	17.42	14.06	3.36
SE1	1:1	150 minutos	81.2	38.67	20.78	17.89	43.35	3.02	17.56	14.82	7.94	17.98	12.36	5.62
SE1	1:1	180 minutos	78.1	34.50	16.76	17.74	46.70	1.00	21.07	16.73	7.90	18.80	13.68	5.12
SE1	2:1	60 minutos	96.5	39.96	28.87	11.09	43.77	11.26	7.97	19.45	5.09	16.27	14.57	1.70
SE1	2:1	90 minutos	94.4	40.22	24.80	15.42	42.22	6.66	12.31	15.40	7.86	17.56	13.83	3.73
SE1	2:1	120 minutos	87.6	37.69	20.58	17.11	43.88	3.94	16.32	13.83	9.79	18.43	14.02	4.41
SE1	2:1	150 minutos	83.3	34.30	15.98	18.32	46.24	2.74	18.89	14.17	10.44	19.46	12.80	6.66
SE1	2:1	180 minutos	81.5	31.08	11.52	19.56	49.28	1.52	23.00	14.26	10.50	19.64	13.47	6.17
Composición después síntesis enzimática GOS				61.19	61.19	0.00	25.94	12.19	0.00	13.75	0.00	12.87	12.87	0.00

SE2	1:1	60 minutos	96.8	60.23	50.06	10.17	26.54	9.81	3.20	10.65	2.88	13.23	12.30	0.93
SE2	1:1	90 minutos	93.1	58.50	44.29	14.21	27.69	7.72	4.29	10.77	4.91	13.81	11.83	1.98
SE2	1:1	120 minutos	86.0	55.13	37.42	17.71	27.73	5.85	8.34	8.27	5.26	15.14	12.07	3.07
SE2	1:1	150 minutos	83.9	55.90	34.32	21.58	28.09	3.83	10.73	6.60	6.93	16.01	10.78	5.23
SE2	1:1	180 minutos	79.7	53.27	29.43	23.84	30.58	2.96	13.04	7.03	7.55	16.15	11.22	4.93
SE2	2:1	60 minutos	98.5	59.41	52.05	7.36	29.49	7.50	5.55	10.64	5.81	11.10	9.66	1.44
SE2	2:1	90 minutos	92.0	56.33	40.11	16.22	30.22	4.67	9.70	7.03	8.82	13.45	9.78	3.67
SE2	2:1	120 minutos	88.7	52.86	33.37	19.49	33.10	3.36	12.18	7.62	9.95	14.04	9.43	4.61
SE2	2:1	150 minutos	84.6	51.14	26.82	24.32	33.03	2.26	13.03	6.71	11.03	15.83	9.69	6.14
SE2	2:1	180 minutos	79.4	49.67	23.79	25.88	33.95	1.45	14.22	8.16	10.13	16.38	10.58	5.80

Total carbohidratos (%): % de carbohidratos presentes en la mezcla en relación con los carbohidratos iniciales.

M: monosacáridos; D: disacáridos; T: trisacáridos; La: lactosa; Lu: lactulosa.

Is: isomerizados; N Is: no isomerizados

SE1 y SE2: reacción de síntesis enzimática de GOS a partir de lactosa (ver Tabla III-21).

6.4. Anexo 4. Índices

6.4.1. Índice de Tablas

Tabla I-1. Ingredientes funcionales más importantes.	4
Tabla I-2. Composición química y características de carbohidratos prebióticos y prebióticos potenciales.....	8
Tabla I-3. Densidad, viscosidad y difusividad de diferentes fluidos tipo.....	21
Tabla I-4.- Propiedades críticas de las sustancias más comúnmente empleadas en condiciones supercríticas (145, 146).....	23
Tabla I-5. Aplicaciones industriales del CO ₂ supercrítico en el sector de la alimentación.....	26
Tabla I-6. Modelos termodinámicos.....	34
Tabla II-1. Matriz del diseño experimental.....	47
Tabla II-2. Matriz del diseño experimental.....	54
Tabla II-3. Matriz del diseño experimental.....	55
Tabla II-4. Propiedades físicas de los carbohidratos (207).....	60
Tabla II-5. Composición del grupo de carbohidratos.....	61
Tabla III-1. Solubilidades experimentales (g/L) de los diferentes carbohidratos en los distintos alcoholes a 22, 30 y 40 °C.....	68
Tabla III-2. Solubilidades experimentales (g/L) de las mezclas lactosa/lactulosa y galactosa/tagatosa en los distintos alcoholes a 22, 30 y 40 °C.....	69
Tabla III-3. Medida de la densidad para algunas mezclas carbohidrato-alcohol a diferentes temperaturas.	69
Tabla III-4. Parámetros de los grupos de interacción obtenidos por Ferreira <i>et al.</i> (207) y revisados en este trabajo.	71
Tabla III-5. Desviación media absoluta (AAD%) entre las medidas de solubilidad experimentales y los cálculos del modelo A-UNIFAC.	72
Tabla III-6. Solubilidad de la lactulosa, lactosa, tagatosa y galactosa en SCCO ₂ con etanol/agua (95:5 v/v) como modificador.....	80
Tabla III-7. Solubilidad (fracción molar) de la lactulosa, lactosa, tagatosa y galactosa en SCCO ₂ con 6, 14 y 21% peso de modificador (etanol:agua 95:5 v/v).....	81
Tabla III-8. Propiedades de los carbohidratos puros estudiados.....	85
Tabla III-9. La desviación media (AAPE) y máxima (MAPE) entre los valores de solubilidad experimentales y los calculados por el modelo para los carbohidratos estudiados en este capítulo.	86
Tabla III-10. Experimentos para seleccionar la composición del modificador de la fase supercrítica.....	90
Tabla III-11. Resultados obtenidos para la matriz del diseño experimental (cantidad total extraída, composición porcentual de Lu en el extracto, composición porcentual de La en el extracto y recuperación de Lu y La respecto a las cantidades iniciales de cada carbohidrato).	92
Tabla III-12. Coeficientes de regresión para factores no escalados y estadísticos obtenidos por ajuste de regresión lineal múltiple.....	94
Tabla III-13. Mg de Lu extraída. Valores observados y predichos obtenidos por regresión lineal múltiple en varios experimentos incluyendo el realizado en condiciones óptimas.....	96
Tabla III-14. Efecto del tipo de modificador y la composición de las muestras extraídas en la extracción selectiva de la tagatosa (300 bar, 80 °C, 0.6 mL/min).....	98
Tabla III-15. Resultados obtenidos para la matriz del diseño experimental (cantidad total extraída, composición porcentual de Ta en el extracto, composición porcentual de Ga en el extracto y recuperación de Ta y Ga respecto a las cantidades iniciales de cada carbohidrato).....	99

Tabla III-16. Coeficientes de regresión para factores no escalados y estadísticos obtenidos por ajuste de regresión lineal múltiple.....	101
Tabla III-17. Ensayos adicionales a flujos de modificador mayores que en el diseño experimental inicial, usando una mezcla tagatosa-galactosa 70/30 ps.....	104
Tabla III-18. Matriz del diseño experimental empleado incluyendo las condiciones estudiadas y los valores experimentales.....	110
Tabla III-19. Extracción supercrítica de la mezcla comercial de GOS (CGOS) usando CO ₂ + Etanol/Agua 97.6:2.4 (v/v) como modificador. M: monosacáridos; D: disacáridos; T: trisacáridos y tetrasacáridos. P: presión extracción; T: temperatura extracción: FM: flujo modificador.....	114
Tabla III-20. Extracción supercrítica de la mezcla comercial de GOS (CGOS) usando CO ₂ + Etanol/Agua 95:5 (v/v) como modificador. M: monosacáridos; D: disacáridos; T: trisacáridos y tetrasacáridos. P: presión extracción; T: temperatura extracción: FM: flujo modificador.....	116
Tabla III-21. Síntesis de GOS a partir de lactosa usando el enzima Lactozym 3000 L HP G.....	121
Tabla III-22. Isomerización de GOS con aluminato sódico y ácido bórico.....	123
Tabla III-23. Extracción supercrítica de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos presentes en mezclas de GOS isomerizados con aluminatos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas).....	125
Tabla III-24. Extracción supercrítica de monosacáridos y disacáridos de los GOS isomerizados con aluminatos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de carbohidratos.....	127
Tabla III-25. Extracción supercrítica de los GOS isomerizados con aluminatos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de arena.....	128
Tabla III-26. Extracción supercrítica en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con aluminatos (relación molar 2:1 aluminatos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 50.93% monosacáridos (M), 32.11% disacáridos (D) y 16.96% trisacáridos (T).....	129
Tabla III-27. Relación aldosas/cetosos de las extracciones supercríticas en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con aluminatos (relación molar 2:1 aluminatos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 50.93% monosacáridos (M), 32.11% disacáridos (D) y 16.96% trisacáridos (T).....	131
Tabla III-28. Extracción supercrítica de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos presentes en mezclas de GOS isomerizados con boratos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas).....	132
Tabla III-29. Extracción supercrítica de monosacáridos y disacáridos de los GOS isomerizados con boratos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de carbohidratos.....	134
Tabla III-30. Extracción supercrítica de los GOS isomerizados con boratos (tiempo de reacción de la isomerización = 8 horas) con diferentes cantidades de arena.....	135
Tabla III-31. Extracción supercrítica en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con boratos (relación molar 2:1 boratos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 52.02% monosacáridos (M), 32.41% disacáridos (D) y 15.57% trisacáridos (T).....	136
Tabla III-32. Relación aldosas/cetosos de las extracciones supercríticas en tres etapas de la mezcla de GOS producida por síntesis enzimática a partir de lactosa (SE2) e isomerizada con boratos (relación molar 2:1 boratos/carbohidratos). Composición de la mezcla inicial de GOS (% peso)= 52.02% monosacáridos (M), 32.41% disacáridos (D) y 15.57% trisacáridos (T).....	138
Tabla III-33. Flujos de los distintos compuesto en la simulación del proceso de extracción supercrítica.....	142
Tabla III-34. Resumen de los parámetros más importantes del proceso.....	144
Tabla III-35. Resultados de recuperación de la inversión en años para las combinaciones de las tres variables estudiadas.....	147
Tabla VI-1. Isomerización de GOS con aluminato sódico y ácido bórico.....	173

6.4.2. Índice de Figuras

Fig. 0-1.-Diagrama de flujo del desarrollo de esta memoria.....	149
Fig. I-1.- Distintas denominaciones de.....	1
Fig. I-2.- Factores tecnológicos que influyen la funcionalidad de los alimentos funcionales.	3
Fig. I-3.- Representación bidimensional y tridimensional de la lactulosa y la lactosa	9
Fig. I-4.- Mecanismo principal de acción de la lactulosa (28).	10
Fig. I-5. - Representación bidimensional y tridimensional de la galactosa y la tagatosa.	12
Fig. I-6.-Pasos de la vía química.....	13
Fig. I-7.-Diagrama esquemático de los procesos químicos y enzimáticos para la producción de tagatosa.....	14
Fig. I-8.-Esquema que representa los procesos de producción de los oligosacáridos.	16
Fig. I-9.-Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT: punto triple, PC: punto crítico, P _c : presión crítica, T _c : temperatura crítica.....	22
Fig. I-10.-Desaparición de las fases en el punto crítico.....	22
Fig. I-11.-Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos	29
Fig. I-12.-Modelos de representaciones de las propiedades físicas.....	33
Fig. I-13.-Diagrama de fases PV para una sustancia pura.....	39
Fig. I-14.-Técnicas experimentales para determinar solubilidades supercríticas.....	40
Fig. II-1.-Distribución de la muestra en la celda.	49
Fig. II-2.-Esquema del sistema de extracción supercrítica empleado.	49
Fig. II-3.-Esquema del dispositivo para la recogida de extractos después de la extracción supercrítica.	51
Fig. II-4a y II-4b.-Anillos Fenske y Perlitas de Cristal	51
Fig. II-5.-Programas utilizados para la separación de trimetil silil éteres de: (a) lactosa, lactulosa y sus mezclas; (b) monosacáridos y sus mezclas; (c) Vivinal GOS® e isomerizados de galactooligosacáridos.....	58
Fig. III-1.-Esquema de trabajo empleado para la medida de solubilidades.....	67
Fig. III-2.-Solubilidad relativa cetosa/aldosa en diferentes alcoholes a 40 °C.	68
Fig. III-3.- Solubilidad de los carbohidratos en isopropanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (△) tagatosa, (●) lactosa y (○) lactulosa. Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.	72
Fig. III-4.- Solubilidad de los carbohidratos en <i>n</i> -propanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa y (●) lactosa; referencia (188) (*) glucosa. Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.	72
Fig. III-5.- Solubilidad de los carbohidratos en etanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa, (●) lactosa y (○) lactulosa; (+) fructosa (189); (×) glucosa (191); (□) glucosa (195); (-) lactosa (190); Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.	73
Fig. III-6.- Solubilidad de los carbohidratos en metanol. Valores experimentales: este estudio (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa, y (●) lactosa; (+) fructosa (189); (×) glucosa (191); Líneas continuas: cálculos A-UNIFAC.	73
Fig. III-7. Representación logarítmica de los valores de solubilidad de los diferentes carbohidratos calculados <i>versus</i> valores experimentales en metanol, etanol, isopropanol y <i>n</i> -propanol. Valores experimentales (nuestro estudio): (◆) glucosa, (◇) fructosa, (▲) galactosa, (△) tagatosa, (●) lactosa y (○) lactulosa.	74
Fig. III-8.- Solubilidad de carbohidratos en agua. Valores experimentales: referencia (191) (◆) glucosa, referencia (189) (◇) fructosa y referencia (190) (●) lactosa. Líneas: cálculos modelo A-UNIFAC.....	74
Fig. III-9.-Comparación entre valores experimentales (5-7) de carbohidratos en mezclas alcohol-alcohol y alcohol-agua y predicciones del modelo A-UNIFAC. (a) glucosa-metanol-agua a (▲) 40°C y (△) 60°C; glucosa-etanol-agua a (■) 40°C y (□) 60°C. (b) glucosa-metanol-etanol a (●) 40°C y (●) 60°C. (c) fructosa-metanol-agua a (●) 25°C (■) 40°C y (▲) 60°C. (d) lactosa-etanol-agua a (●) 25°C (■) 40°C y (▲) 60°C. .	75
Fig. III-10.- (----) Fructosa, (----) Glucosa y (----) solubilidad relativa Fructosa/Glucosa en mezclas etanol:agua según predicciones del método A-UNIFAC.	76

Fig. III-11.-Esquema de trabajo empleado para la medida de solubilidades supercríticas.....	79
Fig. III-12.-Solubilidad de la lactosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	82
Fig. III-13.-Solubilidad de la lactosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	82
Fig. III-14.-Solubilidad de la lactulosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	83
Fig. III-15.-Solubilidad de la lactulosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	83
Fig. III-16.-Solubilidad de la galactosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	83
Fig. III-17.-Solubilidad de la galactosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	83
Fig. III-18.-Solubilidad de la tagatosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 60 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	84
Fig. III-19.-Solubilidad de la tagatosa en SCCO ₂ + etanol/agua 95:5 v/v a 100 °C. Valores experimentales: (●) 6 ps%, (■) 14 ps%, (▲) 21 ps%.....	84
Fig. III-20.-Esquema de trabajo empleado para el fraccionamiento supercrítico de la mezclas de carbohidratos.....	88
Fig. III-21.-Extracciones supercríticas de mezclas lactulosa-lactosa 70/30 (% en peso) para 300 bar/60 °C/0.2 mLmin ⁻¹ flujo de modificador. 1. Patrón interno (β-fenil-glucósido); 2. Lactulosa; 3. Lactosa. (a) modificador etanol/agua 95/5 (v/v); (b) modificador etanol/agua 92.5/7.5 (v/v); (c) modificador etanol/agua 90/10 (v/v).....	91
Fig. III-22.-Cromatogramas de los experimentos 1 (a); 3 (b); 6 (d); y 7 (c). 1. Patrón interno (β-fenil-glucósido); 2. Lactulosa; 3. Lactosa.....	92
Fig. III-23.-Representación del diagrama de Pareto estandarizado con el efecto de cada variable en el modelo dividido por su error estándar para dos variables respuesta: (a) mg lactulosa extraída y (b) mg lactosa extraída. La línea vertical corresponde a los tests de significación de los efectos a un nivel de confianza del 95 %. La leyenda de las barras corresponde a las variables del modelo (P=presión de extracción, T=temperatura de extracción, M=flujo del modificador).....	93
Fig. III-24.-Eficiencia de la extracción para algunos experimentos de las Tablas III-10 y III-11, función del contenido en modificador: (—■—) 300 bar y 60 °C; (—■—) 300 bar y 100 °C; (—▲—) 100 bar y 100 °C.....	94
Fig. III-25.-Representación de la superficie de respuesta para las variables estudiadas: (a) mg lactulosa extraída (Lu (mg)) y (b) mg lactosa extraída (La (mg)) con flujo del modificador a 0.2 mL/min.....	95
Fig. III-26.-Valores observados <i>versus</i> estimados por el modelo de regresión lineal múltiple.....	97
Fig. III-27.-Cromatogramas de las extracciones supercríticas de las mezclas tagatosa-galactosa 70/30 (% en peso) empleando como modificador: <i>n</i> -butanol (a); <i>n</i> -propanol (b); isopropanol (c); etanol (d); etanol/agua (90/10, v/v) (e); y metanol (f). 1. Tagatosa; 2. Galactosa; 3. Patrón interno (β-fenil-glucósido).....	98
Fig. III-28.-Cromatogramas de los experimentos 1 (a); 6 (b) de la Tabla III-17; 1. Tagatosa; 2. Galactosa; 3. Patrón interno (β-fenil-glucósido).....	100
Fig. III-29.-Representación del diagrama de Pareto estandarizado con el efecto de cada variable en el modelo dividido por su error estándar para dos variables respuesta: (a) mg tagatosa extraída y (b) mg galactosa extraída. La línea vertical corresponde a los tests de significación de los efectos a un nivel de confianza del 95 %. La leyenda de las barras corresponde a las variables del modelo (P=presión de extracción, T=temperatura de extracción, M=flujo del modificador).....	101
Fig. III-30.-Representación de la superficie de respuesta para las variables seleccionadas: miligramos de tagatosa extraída (Ta (mg)) y miligramos de galactosa (Ga (mg)). Para Ta, T=80 °C, y para Ga P=200 bar. .102	
Fig. III-31.-Recuperación de tagatosa obtenida en los experimentos, función de la cantidad (%vol.) de isopropanol presente en la fase supercrítica. Flujo de modificador: (■) 0.2 mL/min; (▲) 0.3 mL/min; (●) 0.4 mL/min; (◆) 0.6 y 0.7 mL/min. Constante CO ₂ líneas de densidad: (—) 300 bar, 60 °C (ρ _{CO2} = 830 kg/m ³); (·····) 300 bar, 100 °C (ρ _{CO2} = 662 kg/m ³) y (— —) 100 bar, 100 °C (ρ _{CO2} = 189 kg/m ³).....	103

Fig. III-32.-Cromatogramas de los experimentos 300 bar/80 °C/0.6 mL·min ⁻¹ (a) ; 300 bar/60 °C/0.7 mL·min ⁻¹ (b) ; 300 bar/80 °C/0.6 mL·min ⁻¹ (c) ; 300 bar/80 °C/0.7 mL·min ⁻¹ (d) ; 1. Tagatosa; 2. Galactosa; 3. Patrón interno (β -fenil-glucósido).....	104
Fig. III-33.-Esquema de trabajo realizado para el fraccionamiento supercrítico de mezclas complejas de carbohidratos	108
Fig. III-34.-Composición del Vivinal GOS® por cromatografía de gases.	109
Fig. III-35.-Composición de los carbohidratos disueltos en las mezclas etanol/agua en función del contenido en agua.	111
Fig. III-36.- (a) Cromatograma experimento 8; (b) Cromatograma experimento 24; 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.....	111
Fig. III-37.-Variable respuesta mg/mL disacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Diagrama de Pareto con el efecto de cada término en el modelo.	112
Fig. III-38.-Variable respuesta mg/mL disacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Superficie de respuesta para cada variable respuesta.....	112
Fig. III-39.-Variable respuesta mg/mL trisacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Diagrama de Pareto con el efecto de cada término en el modelo.	113
Fig. III-40.-Variable respuesta mg/mL trisacáridos/ mg/mL monosacáridos para contenido en agua entre el 0 y 5 %. Superficie de respuesta para cada variable respuesta.....	113
Fig. III-41.- (a) Cromatograma experimento 1 paso 1 ; (b) Cromatograma experimento 1 paso 2; (c) Cromatograma experimento 3 paso 1 ; (d) Cromatograma experimento 3 paso 2; 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.....	115
Fig. III-42.- (a) Cromatograma experimento 1 paso 1 ; (b) Cromatograma experimento 1 paso 2; (c) Cromatograma experimento 2 paso 1; (d) Cromatograma experimento 2 paso 2; (e) Cromatograma experimento 1 residuo; (f) Cromatograma experimento 2 residuo; 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos; 5. Tetrasacáridos.....	118
Fig. III-43.-Diagrama de flujo del proceso.	120
Fig. III-44.-Cromatogramas de los experimentos (a) SE1 1:1 8 horas isomerización de GOS con aluminato sódico; (b) SE2 2:1 8 horas isomerización de GOS con ácido bórico. 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.....	124
Fig. III-45.-Cromatogramas de los experimentos (a) 1ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (b) 2ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (c) 3ª etapa etanol/agua 90:10 v/v. 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.	130
Fig. III-46.-Cromatogramas de los experimentos (a) 1ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (b) 2ª etapa etanol/agua 95:5 v/v; (c) 3ª etapa etanol/agua 90:10 v/v. 1. Monosacáridos; 2. Patrón interno (β -fenil-glucósido); 3. Disacáridos; 4. Trisacáridos.	137
Fig. III-47.-Diagrama de flujo del proceso.....	140
Fig. III-48.-Diagrama de flujo de la simulación del proceso con el software AspenPlus V7	141
Fig. III-49.-Diagrama de flujo del proceso industrial.....	148

6.5. Anexo 5. Publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis

1. Montañés, F.; Fornari, T.; Martín-Álvarez, P. J.; Corzo, N.; Olano, A.; Ibáñez, E., Selective Recovery of Tagatose from Mixtures with Galactose by Direct Extraction with Supercritical CO₂ and Different Cosolvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (21), 8340-8345. <http://10.1021/jf0618123>
2. Montañés, F.; Fornari, T.; Martín-Álvarez, P. J.; Montilla, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Ibáñez, E., Selective Fractionation of Disaccharide Mixtures by Supercritical CO₂ with Ethanol as Co-Solvent. *Journal of Supercritical Fluids* 2007, 41, (1), 61-67. <http://10.1016/j.supflu.2006.08.010>
3. Montañés, F.; Olano, A.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Modeling Solubilities of Sugars in Alcohols Based on Original Experimental Data. *Aiche Journal* 2007, 53, (9), 2411-2418. <http://10.1002/aic.11258>
4. Montañés, F.; Corzo, N.; Olano, A.; Reglero, G.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Selective Fractionation of Carbohydrate Complex Mixtures by Supercritical Extraction with CO₂ and Different Co-Solvents. *Journal of Supercritical Fluids* 2008, 45, (2), 189-194. <http://10.1016/j.supflu.2007.08.012>
5. Montañés, F.; Fornari, T.; Stateva, R. P.; Olano, A.; Ibáñez, E., Solubility of Carbohydrates in Supercritical Carbon Dioxide with (Ethanol +Water) Cosolvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 2009, 49, 16-22. <http://10.1016/j.supflu.2008.11.014>
6. Montañés, F.; Olano, A.; Reglero, G.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Supercritical Technology as an Alternative to Fractionate Prebiotic Galactooligosaccharides. *Separation and Purification Technology* 2009, 66, 383-389. <http://10.1016/j.seppur.2008.12.006>
7. Montañés, F.; Olano, A.; Ibáñez, E.; Fornari, T., Supercritical Fluid Purification of Complex Prebiotic Carbohydrate Mixtures Produced by Enzymatic Transglycosilation and Isomerized with aluminate and borate reagents. *Journal of Supercritical Fluids*.Enviado.

